

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANAINA LUSTOSA DE MELLO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA
DO GENE DA GLICOPROTEÍNA S DE CORONAVÍRUS BOVINO ASSOCIADO À
DOENÇA RESPIRATÓRIA**



PALOTINA

2018

JANAINA LUSTOSA DE MELLO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA
DO GENE DA GLICOPROTEÍNA S DE CORONAVÍRUS BOVINO ASSOCIADO À
DOENÇA RESPIRATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabete Takiuchi

PALOTINA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

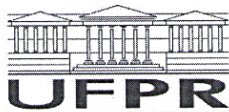
M527 Mello, Janaina Lustosa de
Isolamento, caracterização molecular e análise filogenética
do gene da glicoproteína S de coronavírus bovino associado
à doença respiratória / Janaina Lustosa de Mello
. – Palotina, 2018
85f.

Orientadora: Elisabete Takiuchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Caracterização molecular. 2. Coronavírus bovino.
3. Filogenia. I. Takiuchi, Elisabete. II. Universidade
Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636

Ficha catalográfica elaborada por Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **JANAINA LUSTOSA DE MELLO** intitulada: **Isolamento, caracterização molecular e análise filogenética do gene da glicoproteína S de coronavírus bovino associado à doença respiratória**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Palotina, 19 de Abril de 2018.

ELISABETE TAKIUCHI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

EDSEL ALVES BEUTTEMMÜLLER

Avaliador Externo (UEL)

MARCO ANTÔNIO BACELLAR BARREIROS

Avaliador Externo (UFPR)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Janaina Lustosa de Mello, filha de Luiz Claudio de Mello e Geovana Aparecida Ribas Lustosa, natural de Cascavel, 22 de março de 1991. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina em 2014. No ano de 2016, ingressou no mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, atuando principalmente na área de Virologia animal.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe Geovana, ao meu padrasto Miguel, ao meu sobrinho Lucas, às minhas irmãs Ana Claudia e Giselle e cunhados, por todo o amparo cedido durante esse período. Não tenho palavras suficientes para expressar tamanha gratidão por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que tudo parecia dar errado. Obrigada por aguentarem meus dias de mau humor, de estresse, mas principalmente obrigada pela ajuda e pelo carinho, cada um com seu jeitinho. Vocês sempre serão meu porto seguro, para o que der e vier em qualquer etapa da vida.

À minha orientadora, Elisabete Takiuchi, a qual eu considero como uma segunda mãe e excelente amiga. Desde a graduação, você se mostrou sempre presente, paciente e nos ensinando como qualquer coisa feita com disciplina e determinação tem bons resultados. Você é exemplo de profissional e mulher que levarei para o resto da vida. Agora levo comigo uma carga de aprendizado muito grande. Obrigada!

A toda equipe de professores, técnicos e colaboradores da UFPR, em especial a do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade, apoio e aprendizado. Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro durante esses dois anos.

À banca avaliadora, Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros e Prof. Dr. Edsel Alves Beuttemuller por terem aceitado o convite.

À equipe do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri e a doutoranda Flávia Possatti, que sempre esteve disposta a realizar as técnicas pertinentes relacionadas à dissertação e me auxiliar quando precisasse.

Às equipes dos laboratórios parceiros da UFPR Setor Palotina: BIOTEC e Microbiologia, do bloco Multidisciplinar. Obrigada pelo suporte técnico e laboratorial durante a execução da parte prática do trabalho.

Às grandes amigas que realizei dentro do Laboratório de Diagnóstico em Virologia Animal, não só nesse período, mas desde a graduação, em especial as “top kengas”: Andressa, Dani, Jessica Gallego, Izabel, Ruana, Cris e Joice. Sem vocês, a caminhada seria árdua. Sentirei saudades dos nossos encontros, das risadas, dos

churrascos, mas também da presença de vocês quando as coisas não iam bem. Tudo ficava mais fácil. Obrigada de coração!

Às meninas que participaram e me auxiliaram na realização desse trabalho: Giulia, Carol Mucellini, Carol Melchior, Rebeca, Carla, Paula, Jessica, Alessandra e Julia. Obrigada pela ajuda e paciência nos momentos de inquietude.

Às lindas do “Happy hour”: Fernanda, Eloisa, Jaque e Stella, que desde o ensino fundamental estiveram lado a lado em diversos momentos da minha vida. Obrigada pelo apoio e por se mostrarem sempre presentes.

Às minhas amigas Karen e Maria Luiza, que desde a graduação cultivamos e mantemos uma amizade maravilhosa. Sem a ajuda de vocês, com certeza eu não teria concluído o mestrado com êxito. Obrigada pelos conselhos diários, carinho e apoio!

Agradeço a todos os meus amigos, de Palotina ou Cascavel, que de alguma forma me apoiaram durante esse período, mas principalmente: ao Julio Cezar, pelo carinho, amizade e assistência com as coletas. Sem sua ajuda, o trabalho não teria saído. E Felipe Eduardo, por me socorrer quando precisava e pelas risadas quando as coisas não iam bem.

Por fim, agradeço a presença do meu protetor que me rege, pela sabedoria nos momentos de angústia e por ter me guiado e me inspirado nos momentos em que tudo parecia sem sentido.

“A lei da mente é implacável: o que você pensa, você cria; o que você sente, você atrai; o que você acredita, torna-se realidade.”

Buda

RESUMO

O coronavírus bovino (BCoV) é um vírus com duplo tropismo (entérico e respiratório) e desencadeia manifestações clínicas entéricas e respiratórias nos bovinos, em doenças como a disenteria de inverno (*winter dysentery*) em bovinos adultos, diarreia neonatal em bezerros e doença respiratória. O presente trabalho reporta a detecção de BCoV associado à doença respiratória em animais jovens e descreve a análise molecular e filogenética do isolado respiratório (BOV19-NS) com base em fragmentos parciais (1447 nt e 438 nt) do gene S. O trabalho também descreve o sucesso do isolamento da BOV19-NS em células da linhagem HRT-18 e compara molecularmente as sequências do gene da glicoproteína S do BCoV obtidas diretamente da amostra clínica e do isolado adaptado ao longo das passagens celulares. A matriz de identidade do fragmento maior (1447 nt) demonstrou maior identidade (98,2%) da amostra BOV19-NS com isolados brasileiros de BECoV, coletados em 2004, no estado de Minas Gerais (BRUEL-1, BRUEL-2 e BRUEL-3), enquanto do fragmento menor (438 nt) a maior identidade (98,4%) foi observada com um isolado brasileiro de BECoV coletado em 2014 no Rio de Janeiro (PD1). A árvore filogenética demonstrou uma tendência de separação filogeográfica dos isolados de BCoV. Comparando com o protótipo ancestral de BCoV, cepa Mebus, foram identificadas 33 substituições nucleotídicas, das quais 15 resultaram em mutações não sinônimas (9 transições e 6 transversões). Uma alteração de aa inédita foi detectada no resíduo 528 (Ala⁵²⁸→Val) da região hipervariável da S1 em um isolado selvagem. Em comparação com a amostra selvagem, foi identificada apenas uma substituição nucleotídica na posição de nt 2428 (AAT→TAT) a partir da 7ª passagem, que resultou na transversão, carga neutra-neutra, Asn⁸¹⁰→Tyr. Este é o primeiro relato de isolamento de BCoV em cultivo celular associado à doença respiratória no Brasil. Além disso é pioneiro na caracterização molecular do isolado selvagem e do respectivo adaptado em cultivo após sucessivas passagens.

Palavras-chave: Caracterização molecular, coronavírus bovino, filogenia, gene S, isolamento.

ABSTRACT

ISOLATION, MOLECULAR CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE S GLYCOPROTEIN GENE OF BOVINE CORONAVIRUS ASSOCIATED WITH RESPIRATORY DISEASE

Bovine coronavirus (BCoV) is a dual tropism virus (enteric and respiratory), which triggers enteric and respiratory clinical manifestations in cattle, with diseases such as winter dysentery in adult cattle, neonatal diarrhea in calves and respiratory disease. The present work reports the detection of BCoV associated with respiratory disease in young animals and describes the molecular and phylogenetic analysis of the respiratory isolate (BOV19-NS) based on partial fragments (1447 nt and 438 nt) of the S gene. Also, it reports the success of BOV19-NS isolation in HRT-18 cells lineage; molecular comparison of the BCoV sequences obtained directly from the clinical sample and the adaptation of the isolate along the cell passages. The biggest identity matrix (1447 nt) demonstrated greater identity (98.2%) of the BOV19-NS sample with Brazilian isolates of enteric BCoV, collected in 2004 in Minas Gerais (BRUEL-1, BRUEL-2 and BRUEL-3), while the smaller fragment showed the highest identity (98.4%) with a Brazilian isolate of enteric BCoV, collected in 2014 in Rio de Janeiro (PD1). The phylogenetic tree showed a tendency of phylogeographic separation of BCoV isolates. Comparing with the ancestral prototype of BCoV, Mebus strain, 33 nucleotide substitutions were identified, of which 15 resulted in non-synonymous mutations (9 transitions and 6 transversions). A new aa change was detected at residue 528 (Ala528→Val) of the hypervariable region of S1 in a wild type isolate. Compared to the wild type isolate, only one nucleotide substitution at nt position 2428 (AAT→TAT) was identified from the 7th passage, which resulted in the Asn810 → Tyr transversion, neutral-neutral. This is the first report of BCoV isolation in cell culture associated with respiratory disease in Brazil. It is also pioneer in the molecular characterization of the wild isolate and its adapted culture after successive passages.

Keywords: Bovine coronavirus, isolation, molecular characterization, phylogeny, S gene.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1** - Relações filogenéticas entre os membros da subfamília Coronavirinae baseada na análise da sequência de aminoácidos da poliproteína pp1ab. A árvore mostra quatro grupos monofiléticos, representados por cores distintas, correspondentes aos gêneros Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus e Deltacoronavirus.17
- FIGURA 2** - Organização genômica de diferentes gêneros de CoV.18
- FIGURA 3** - Diagrama esquemático dos componentes do genoma do coronavírus bovino (BCoV). (A) Estrutura esquemática da partícula de BCoV com todos os componentes estruturais; (B) Organização do genoma do BCoV (os comprimentos estão simulados baseados nos tamanhos do gene correspondente); (C) Subunidades da glicoproteína de espícula (S); S1 e S2.....23
- FIGURA 4** - Desenho esquemático da glicoproteína S do BCoV, evidenciando a localização aproximada do domínio RBD e a região polimórfica, ou HVR, da subunidade S1. A flecha preta indica o sítio de clivagem da proteína S em duas subunidades, S1 e S2, entre os aa 768 e 769.24

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1** - Análise filogenética baseada na sequência parcial de 1447 nt (nt 1258 a 2705 em relação a cepa Mebus) do gene S de isolados de BCoV. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo evolutivo *Tamura-Nei*, com distribuição *Gamma* 5, sítios Invariantes (ML + TN93 + G + I) e 1.000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* acima de 70 são indicados próximos aos nós. Os isolados incluídos na análise estão identificados com o número de acesso *GenBank*/nome da cepa/país de origem. A sequência obtida neste estudo está indicada pelo símbolo ▲55
- FIGURA 2** - Análise filogenética baseada em 438 nt da região polimórfica HVR do gene S (nt 1339 – 1777 em relação a cepa Mebus) de diferentes isolados de BCoV. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo evolutivo *Tamura-Nei*, com distribuição *Gamma* 5 (ML + TN93 + G) e 1.000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* acima de 70 são indicados próximos aos nós. Os isolados incluídos na análise estão identificados com o número de acesso *GenBank*/nome da cepa/país de origem. A sequência obtida neste estudo está indicada pelo símbolo ▲56
- FIGURA 3** - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos (aa 420-903 em relação à cepa protótipo Mebus) do gene S obtidas do sequenciamento direto da amostra BOV19-NS-UFPR/Brazil e após a 3, 4^a, 7^a, 8^a e 9^a passagens (3P, 4P, 7P, 8P e 9P) e cepas protótipos de BCoV. Os pontos (.) indicam aa idênticos; o quadro vermelho indica a região HVR (aa 452 a 593); o quadro verde indica o sítio de clivagem proteolítica (aa 763 a 768); as molduras pretas indicam os potenciais sítios de glicosilação; as flechas pretas indicam os resíduos de cisteína.58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Pares de primers utilizados para amplificação parcial do gene S do BCoV	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa – aminoácido
Bat-CoV HKU9 – Coronavírus HKU9 do morcego *Rousettus*.
BCoV – Coronavírus bovino (*Bovine coronavirus*)
BECoV – Coronavírus bovino entérico (*Bovine enteric coronavirus*)
BoHV-1 – Herpesvírus bovino tipo 1
BRCoV – Coronavírus bovino respiratório (*Bovine respiratory coronavirus*)
BRSV – Vírus respiratório sincicial bovino (*Bovine respiratory syncytial virus*)
BVDV – Vírus da diarreia viral bovina (*Bovine viral diarrhea virus*)
BWCoV- SW1 – Coronavírus da baleia beluga SW1 (*Beluga Whale coronavirus*)
CCoV – Coronavírus canino (*Canine coronavirus*)
cDNA – DNA complementar
CDRB – Complexo doença respiratória bovina
CEUA – Comissão de ética no uso de animais
CrCoV – Coronavírus respiratório canino (*Canine respiratory coronavirus*)
CTD – Domínio C-terminal
Da – Dalton
dNTP – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPEC – Dietilpirocarbonato
DRB – Doença Respiratória Bovina
ECoV – Coronavírus equino (*Equine coronavirus*)
ECP – Efeito citopático
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
FCoV – Coronavírus felino (*Feline coronavirus*)
HCoV-229E – Coronavírus humano 229E (*Human coronavirus 229E*)
HCoV-HKU1 – Coronavírus humano HKU1 (*Human coronavirus HKU1*)
HCoV-NL63 – Coronavírus humano NL63 (*Human coronavirus NL63*)
HCoV-OC43 – Coronavírus humano OC43 (*Human coronavirus OC43*)
HR – *Heptad repeat*
HRT-18 – Células de adenocarcinoma retal humano (*Human rectum adenocarcinoma*)
HVR – Região hiper-variável (*Hypervariable region*)
IBV – Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (*Avian infectious bronchitis virus*)
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee of Taxonomy of Virus*)
Kb – kilobase
kDa – kilodalton
MERS-CoV – Síndrome respiratória do Oriente Médio (*Middle East Respiratory Syndrome*)
MHV – Hepatite viral dos camundongos (*Mouse hepatitis virus*)
mM – milimolar
MunCoV-HKU13 – Coronavírus da lonchura HKU13 (*munia coronavirus*)
nm – nanômetro
N-PCR – *Nested-PCR*
nsp – Proteína não estrutural (*Non structural protein*)
nt – Nucleotídeo
NTD – Domínio N-terminal
ORF – Fase de leitura aberta (*Open reading frame*)

pb – pares de bases
PBS – Tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)
PCoV HKU15 – Coronavírus suíno HKU15 (*Porcine coronavirus HKU15*)
PCR – Reação em cadeia pela polimerase (*Polymerase chain reaction*)
PEDV – Vírus da diarreia epidêmica suína (*Porcine epidemic diarrhea virus*)
pH – Potencial hidrogeniônico
PHEV – Vírus hemaglutinante da encefalomielite suína (*Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus*)
PI-3 – Parainfluenza bovina
pmol – picomol
PRCV – Coronavírus respiratório suíno (*Porcine respiratory coronavirus*)
Proteína E – Proteína de membrana pequena ou envelope
Proteína HE – Proteína hemaglutinina/esterase
Proteína I – Proteína interna
Proteína M – Proteína transmembrana
Proteína N – Proteína do nucleocapsídeo
Proteína S – Proteína de espícula ou *spike*
q-PCR – PCR quantitativo ou em tempo real
RBD – Domínio de Ligação ao Receptor Celular (*Receptor binding domain*)
RdRp – RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*)
RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
RNAm – RNA mensageiro
RNAm_{sg} – RNA mensageiro subgenômico
RNAs_g – RNA subgenômico
rpm - Rotação por minuto
RT - Transcrição reversa (*Reverse transcription*)
SARS-CoV – Síndrome respiratória aguda arave (*Severe acute respiratory syndrome*)
SDS - Sódio dodecil sulfato
SN – Semi-*nested*
ssRNA - RNA de fita simples (*single stranded RNA*)
TBE - Tris, ácido Bórico e ácido etilenodiamino tetra-acético.
TCoV – Coronavírus dos perus (*Turkey coronavirus*)
TGEV – Vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (*Transmissible gastroenteritis coronavirus*)
TGI – Trato gastrointestinal
ThCoV-HKU12 – Coronavírus do tordo HKU12 (*Thrush coronavirus*)
UV – Radiação ultravioleta
WD – Disenteria de inverno (*Winter dysentery*)
µg - Micrograma
µL – Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 CORONAVÍRUS	16
2.2 CORONAVÍRUS BOVINO	21
2.2.1 Epidemiologia.....	24
2.2.2 Isolados entéricos e respiratórios	26
2.2.3 Diagnóstico.....	29
2.3 REFERÊNCIAS – REVISÃO DE LITERATURA.....	33
3 OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 CAPÍTULO 1 – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DA GLICOPROTEÍNA S DE CORONAVÍRUS BOVINO ASSOCIADO À DOENÇA RESPIRATÓRIA.....	46
4.1 INTRODUÇÃO	47
4.2 MATERIAL E METODOS	48
4.3 RESULTADOS	52
4.4 DISCUSSÃO	59
4.5 CONCLUSÃO	64
4.6 REFERÊNCIAS - CAPÍTULO 1.....	65
5 CONCLUSÃO GERAL	71
6 REFERÊNCIAS	72
7 APÊNDICES.....	86

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Coronavírus Bovino (BCoV) pertence à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus* e apresenta genoma RNA de fita simples com polaridade positiva, com tropismo por células epiteliais do trato respiratório e entérico (ICTV, 2017). Dentre os vírus RNA, o BCoV é o que possui maior tamanho de genoma (27-32 kb) e dispõe de mutações pontuais em diversas regiões. Além disso, sua complexa maquinaria de replicação lhe confere a capacidade da recombinação homóloga (BARIC et al., 1995; DENISON et al., 2011; FU e BARIC, 1992). No terço final do genoma estão localizados os genes das proteínas estruturais: glicoproteína da espícula (S); proteína do envelope (E); proteína de membrana (M), proteína do nucleocapsídeo (N); glicoproteína hemaglutinina esterase (HE) e proteína interna (I) (FISCHER et al., 1997).

O BCoV é responsável por três diferentes síndromes clínicas em bovinos: diarreia neonatal em bezerros, disenteria de inverno em bovinos adultos (*winter dysentery*) e infecções respiratórias em bovinos de idades variadas, sendo um dos patógenos recentemente incluídos no Complexo Doença Respiratória Bovina, ou febre do transporte (*shipping fever*) (SAIF, 2010). A doença respiratória geralmente ocorre em animais com o sistema imune debilitado, por decorrência de diversos fatores estressantes, sejam ambientais, de manejo ou do próprio hospedeiro (HICK et al., 2012). Ainda hoje, estudos são realizados para verificar se isolados entéricos possuem características genéticas e antigênicas distintas de isolados respiratórios. Os resultados são variáveis, porém indicam que uma deriva genética ocorre ao longo do tempo, resultando em isolados com duplo tropismo (HASOKSUZ et al., 2002b).

A investigação da ocorrência da doença nos rebanhos requer testes diagnósticos com boa sensibilidade e especificidade. A proteína N possui domínios bem preservados entre os isolados de BCoV constituindo alvo preferencial para fins de diagnóstico (HISCOX, CAVANAGH e BRITTON, 1995). Em contrapartida, os estudos de variabilidade genética de BCoV se baseiam na região polimórfica da glicoproteína S. Mudanças de aminoácidos ao longo do tempo, envolvendo principalmente a unidade S1 da glicoproteína, podem resultar na expansão do espectro de hospedeiros e variação no tropismo tecidual. Assim, para o estudo da divergência genética entre isolados, a análise da glicoproteína S é útil para a

compreensão da epidemiologia molecular e evolução genética do BCoV (CHOULJENKO et al., 1998; HASOKSUZ et al., 2002b).

O isolamento do BCoV em culturas celulares é realizado principalmente para produção de massa viral para posterior caracterização genômica/antigênica e filogenia. Apesar de sua difícil adaptação, as células de adenocarcinoma retal humano (HRT-18), demonstram boa permissividade e susceptibilidade para o BCoV, sendo geralmente as células de eleição para o cultivo (SAIF et al., 1988). Os coronavírus (CoV) de uma forma geral, mutam naturalmente após passagens *in vitro* em resposta às condições do cultivo e, por isso, é possível avaliar possíveis alterações de nucleotídeos entre isolados e cepas de referência, principalmente na região hipervariável da glicoproteína S (LAI, ANDERSON e PERLMAN, 2007). No entanto, é igualmente importante avaliar simultaneamente o genoma das amostras extraídas não cultivadas, no sentido de evitar tendências de mutação e alterações da composição antigênica que podem ocorrer após as passagens, proporcionando uma análise mais acurada dos genomas virais (WOO et al., 2010).

A disseminação do BCoV em rebanhos de diferentes regiões do mundo é frequentemente documentada, com alta incidência sorológica em todos continentes, indicando que boa parte do gado foi exposto ao vírus em algum momento (BOILEAU e KAPIL, 2010; CLARK, 1993; SAIF, 2010). No Brasil, relatos envolvendo a detecção e prevalência do vírus com o uso de técnicas diagnósticas sorológicas e moleculares em amostras entéricas já foram descritos em diferentes estados como São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Paraná (ASANO et al., 2010; BARRY et al., 2009; BEZERRA JR et al., 2009; BRANDÃO et al., 2007; JEREZ et al., 2002; OLIVEIRA FILHO et al., 2007; STIPP et al., 2009; TAKIUCHI et al., 2009; TAKIUCHI et al., 2006). No entanto, há uma escassez de estudos envolvendo amostras respiratórias no país, bem como a caracterização molecular e análise filogenética desses isolados (BEUTTEMULLER et al., 2017).

Por esse motivo, o presente estudo tem como objetivo investigar a ocorrência de BCoV em amostras de secreção nasal de bezerros, realizar o isolamento em cultivo celular de uma amostra de secreção nasal em células HRT-18, caracterizar molecularmente e comparar o isolado de BCoV antes e após a adaptação em cultivo celular, por meio do sequenciamento e análise filogenética baseada na sequência parcial do gene S do BCoV.

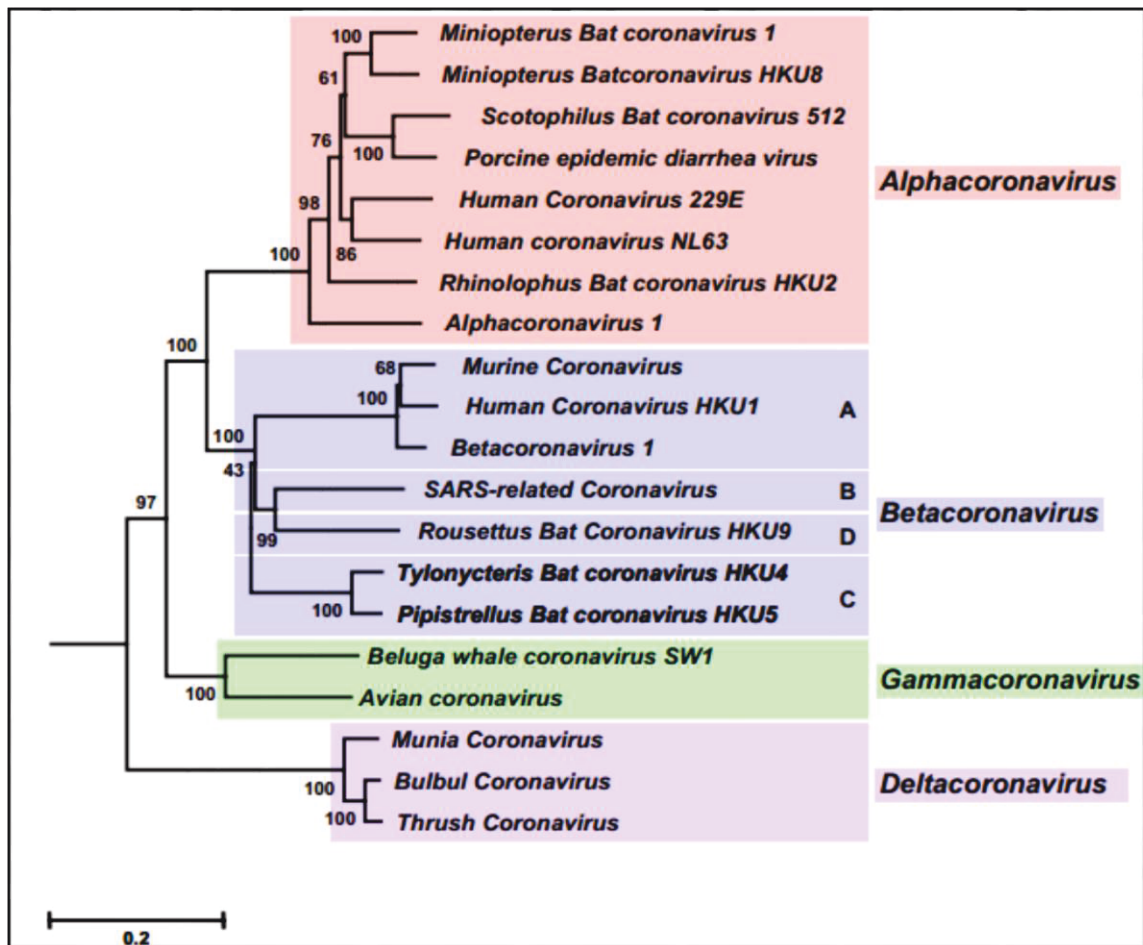
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CORONAVÍRUS

Os coronavírus (CoV) pertencem à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*, a qual é constituída atualmente por quatro gêneros: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. Anteriormente, as espécies de CoV eram divididas em três grupos distintos (1, 2 e 3) com base em relações antigênicas. Com os avanços da biologia molecular e sequenciamento genômico, a atual classificação taxonômica é baseada em estudos filogenéticos envolvendo a poliproteína 1ab (pp1ab) (ICTV, 2017; WOO et al., 2009).

As principais espécies do gênero *Alphacoronavirus* incluem: *Alphacoronavirus* 1 (espécies tipo: vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV), coronavírus respiratório suíno (PRCV), coronavírus felino (FCoV) e canino (CCoV)); vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV); coronavírus humano 229E (HCoV-229E) e NL63 (HCoV-NL63). O gênero *Betacoronavirus* ainda é dividido em grupos A, B, C e D, sendo o grupo A representado pelas espécies: *Betacoronavirus* 1 (espécies-tipo: coronavírus bovino (BCoV), coronavírus humano OC43 (HCoV-OC43), coronavírus equino (ECoV), vírus hemaglutinante da encefalomielite suína (PHEV) e coronavírus respiratório canino (CrCoV)); coronavírus humano HKU1 (HCoV-HKU1) e coronavírus murino – hepatite viral dos camundongos (MHV). No grupo B destaca-se o coronavírus relacionado à Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV); o grupo C inclui a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e o grupo D, o coronavírus HKU9 de morcego *Rousettus* (Bat-CoV HKU9). O gênero *Gammacoronavirus* compreende o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV); coronavírus dos perus (TCoV) e coronavírus da baleia beluga SW1 (BWCoV- SW1). Em 2011, o gênero *Deltacoronavirus* foi incluído, englobando as espécies que afetam mamíferos e aves como coronavírus da lonchura HKU13 ou *munia coronavirus* (MunCoV-HKU13); coronavírus do tordo HKU12 ou *thrush coronavirus* (ThCoV-HKU12) e coronavírus suíno HKU15 (PCoV HKU15) (FIGURA 1) (DE GROOT et al., 2013; VIPR, 2018; WOO et al., 2009).

FIGURA 1 - Relações filogenéticas entre os membros da subfamília *Coronavirinae* baseada na análise da sequência de aminoácidos da poliproteína pp1ab. A árvore mostra quatro grupos monofiléticos, representados por cores distintas, correspondentes aos gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*.



Fonte: DE GROOT et al., (2013).

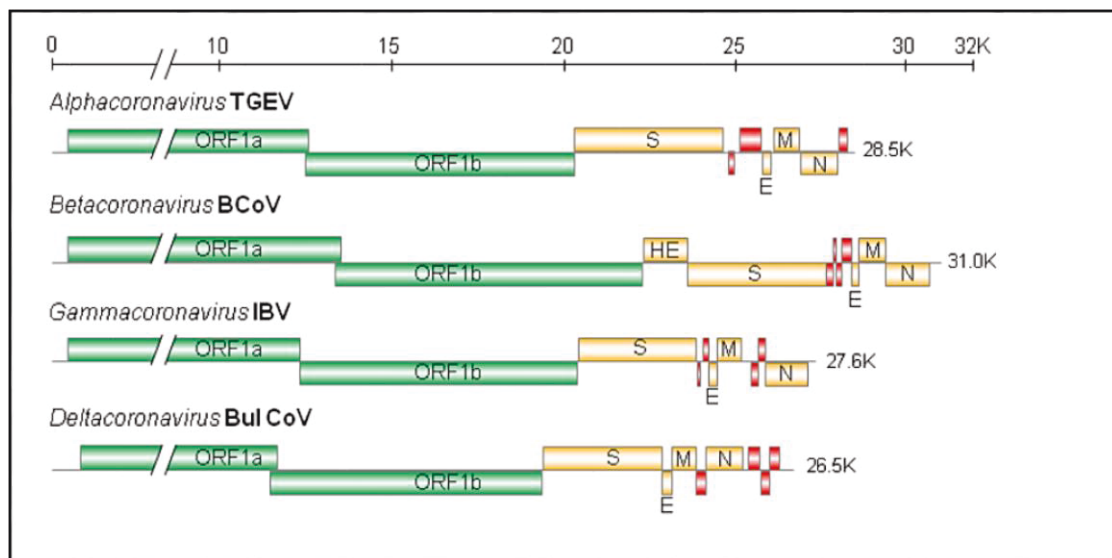
Os CoV são vírus envelopados de aproximadamente 120-160 nm de diâmetro, com a aparência das glicoproteínas de superfície em forma de coroa, o que deu origem ao nome coronavírus. O genoma é constituído por uma fita simples de RNA, não segmentada, com polaridade positiva, cujo tamanho pode variar de 26,4 a 32 kb, sendo o mais longo de todos os vírus RNA já documentados, o que proporciona a esta família viral a flexibilidade para acomodar e modificar genes (GORBALENYA et al., 2006; SAIF, 2010; WOO et al., 2010). Além disso, são policistrônicos, ou seja, seu RNA mensageiro (RNAm) promove a síntese de mais de uma proteína, gerando um conjunto de RNAs subgenômicos (RNAs_g) abrigados em sequências comuns de 5' e 3' (LAI e CAVANAGH, 1997).

Os CoV apresentam diversas fases de leitura aberta (ORFs, do inglês *Open Reading Frames*), que codificam proteínas estruturais e não estruturais (nsp). As duas

maiores ORFs (ORF1a e ORF1b) estão presentes em todos os CoV, ocupando os dois terços da extremidade 5' do genoma. Essas ORFs expressam as nsps envolvidas com a replicação do vírus, e por isso geralmente são referenciadas como o gene da replicase (ENJUANES et al., 2016). A tradução da ORF1a resulta em uma poliproteína 1a (pp1a) e por um mecanismo ribossomal de *frameshift* (-1 *ribosomal frameshifting*) permite a tradução da ORF1b com a consequente produção da poliproteína 1ab (pp1ab) (ZIEBUHR, 2005). Essas poliproteínas, conjuntamente, expressam 16 nsps (nsp1 a nsp16), a maioria delas envolvidas na replicação do genoma viral e na síntese de RNAs. No terço final do genoma estão localizados os genes das proteínas estruturais: glicoproteína da espícula (S); proteína do envelope (E); proteína de membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N) (FISCHER et al., 1997).

Os genes que codificam as proteínas estruturais e que são comuns a todos os CoV, estão dispostos na seguinte ordem 5' - S - E - M - N - 3', intercalados com outras ORFs que codificam proteínas acessórias e nsps específicas de alguns membros de CoV (LAI e CAVANAGH, 1997). Entretanto, somente os membros do gênero *Betacoronavirus* possuem adicionalmente os genes codificadores da glicoproteína HE e a proteína I (SENANAYAKE e BRIAN, 1997). A FIGURA 2 representa as diferenças na organização genômica dos diferentes gêneros de CoV.

FIGURA 2 - Organização genômica de diferentes gêneros de CoV.



Fonte: Adaptado de Ujike e Taguchi, 2015.

A glicoproteína S possui massa molecular de 150 a 180 kDa, forma um trímero no vírion e é organizada em dois domínios de subunidades: S1 (amino-terminal) e S2 (carboxi-terminal) que desempenham diversas funções na interação vírus-hospedeiro (GRAHAM e BARIC, 2010; LIU et al., 2006). Diferentes CoVs apresentam particularidades em relação à clivagem da glicoproteína S. Com algumas exceções, a maioria dos *Alphacoronavirus* e o SARS-CoV (*Betacoronavirus*) albergam uma proteína S que não é clivada. Por outro lado, em alguns *Betacoronavirus* e *Gammacoronavirus*, a proteína é clivada durante a montagem e exocitose dos vírions em subunidades S1 e S2. Proteínas clivadas demonstraram maior propensão para a fusão célula-célula (BELOUZARD et al., 2012).

A subunidade S1 contém dois domínios independentes, o domínio N-terminal (S1-NTD) e o domínio C-terminal (S1-CTD). Geralmente, ambos os domínios de S1 podem atuar como Domínio de Ligação ao Receptor Celular (RBD), localizado aproximadamente entre os resíduos de aminoácidos (aa) 15 a 298 e 326 a 540 no BCoV, que promove a interação com os receptores das células hospedeiras (BIDOKHTI et al., 2013; LI, 2012; PENG et al., 2012). O RBD possui epítomos que são os principais alvos dos anticorpos neutralizantes produzidos pelo hospedeiro infectado. A interação RBD-receptor celular é um dos determinantes mais significativos em relação ao espectro de hospedeiros e à transmissão cruzada entre espécies. Apesar das sequências de aminoácidos de S1 apresentarem um grau de divergência entre gêneros de CoV, estas são relativamente conservadas dentro de cada gênero (LI, 2013; 2015; LI et al., 2006). A comparação das sequências codificadoras da região S1 entre isolados da mesma espécie, ou entre espécies de um determinado gênero de CoV, revela um domínio polimórfico, ou Região Hipervariável (HVR). Alterações na antigenicidade e patogenicidade entre diferentes isolados e cepas de CoV têm sido atribuídas às deleções e substituições detectadas na HVR (BALLESTEROS, SANCHEZ e ENJUANES, 1997; HASOKSUZ et al., 2002b; LAI e CAVANAGH, 1997; REKIK e DEA, 1994).

A subunidade S2, uma proteína transmembrana bem conservada, é responsável pela fusão das membranas virais e celulares do hospedeiro. Esse evento é mediado por rearranjos estruturais de ligação pós-receptor, em que duas regiões denominadas *heptad repeat* (HR1 e HR2) desempenham papel fundamental. Os domínios HR1 e HR2 são constituídos por sete aminoácidos que seguem um padrão de repetição (*abcdefg*), em que os resíduos *a* e *d* são hidrofóbicos, permitindo a

formação de estruturas alfa-helicoidais (BELOUZARD et al., 2012; MILLET e WHITTAKER, 2015).

A proteína de envelope E possui uma pequena fração incorporada nos vírions, o que indica que essa proteína atua dentro da célula do hospedeiro (RAAMSMAN et al., 2000). Inicialmente, a proteína E é distribuída nas membranas intracelulares entre os compartimentos do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, onde participa da montagem da estrutura viral, brotamento e tráfego intracelular (LIM e LIU, 2001).

A proteína de membrana M é a mais abundante do envelope viral e apresenta importante papel na montagem do vírion, interagindo com outras proteínas estruturais (N, E e S) no sítio de brotamento (NEUMAN et al., 2011).

A proteína N é altamente conservada entre os isolados e apresenta funções tanto estruturais, como diretamente na replicação e transcrição dos CoV. Seu papel primário é empacotar o RNAG em complexos de ribonucleoproteínas helicoidais, longas e flexíveis, também chamadas de nucleocapsídeos (MCBRIDE, VAN ZYL e FIELDING, 2014). O nucleocapsídeo tem a função de proteger o genoma e assegurar sua replicação e transcrição apropriada. Durante o ciclo replicativo do vírus, várias cópias da proteína N interagem com as moléculas de RNAG e RNAsg, o que comprova seu papel na transcrição e tradução viral (BARIC et al., 1988; NARAYANAN et al., 2000). O RNAm mais abundante dos CoV codifica a proteína N. No final do ciclo replicativo, durante a montagem dos nucleocapsídeos, há um aumento adicional na síntese para fornecer proteína N suficiente para a montagem da progênie viral. Assim, em células infectadas por CoV, o número de RNAm_{sg} transcritos para essa proteína é muito maior quando comparado às demais proteínas estruturais (HISCOX, CAVANAGH e BRITTON, 1995; KECK et al., 1988).

A RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) apresenta baixa fidelidade na atividade de revisão, culminando com altas taxas de mutação (10^{-5} a 10^{-4} por nucleotídeo por ciclo de replicação), que podem ser significativas para a adaptação, virulência e no surgimento de *quasispecies* dos vírus RNA (DENISON et al., 2011; JARVIS e KIRKEGAARD, 1991). Os CoV, além de comportar mutações pontuais em seu genoma, são capazes de mediar a chamada recombinação homóloga de RNA, ou troca de material genético entre sequências semelhantes, numa taxa aproximada de 20% durante a infecção mista entre cepas relacionadas no mesmo grupo (BARIC et al., 1995). Embora os CoV não possuam um genoma segmentado, as recombinações podem ocorrer devido ao extenso tamanho do genoma, juntamente

com a maquinaria de replicação complexa responsável por dissociar e reassociar a partir de um RNA molde (*copy-choice*), assim como a disponibilidade de cadeias de comprimento total e subgenômicas para troca de molde (DENISON et al., 2011; FU e BARIC, 1992). Fatores como a alta frequência de recombinação homóloga nos CoV, somada às altas taxas de mutação, podem levar à adaptação desses vírus e ao aumento da probabilidade do surgimento de um mutante viral, estendendo a gama de hospedeiros e também a geração de novas cepas e genótipos (VIJGEN et al., 2005; WOO et al., 2006).

Por outro lado, mesmo com todas as características de substituições pontuais e pela complexidade na replicação desses vírus, os CoV e outros grandes vírus da ordem *Nidovirales* replicam com maior fidelidade do que todos os outros vírus RNA polaridade positiva conhecidos. Além disso, por possuírem os maiores genomas RNA conhecidos, é provável que a fidelidade aumentada seja necessária para a manutenção desses grandes genomas (SMITH e DENISON, 2013; SMITH, SEXTON e DENISON, 2014).

Alguns CoV de determinados gêneros da família *Coronaviridae* infectam um espectro restrito de hospedeiros. Em contrapartida, o BCoV e o SARS-CoV podem infectar uma gama hospedeira mais ampla (SAIF, 2004; 2008). Por exemplo, alguns CoV geneticamente e/ou antigenicamente similares ao BCoV (>95% de identidade de nucleotídeos), tem sido detectados em amostras do trato respiratório e intestinal de cães, de humanos e ruminantes selvagens com doença respiratória e entérica (ERLES et al., 2003; HASOKSUZ et al., 2007; TSUNEMITSU et al., 1995; ZHANG et al., 1994b). As razões por BCoV apresentar essa ampla gama de hospedeiros são desconhecidas, mas a presença da hemaglutinina e seu possível papel na ligação a diversos tipos de células pode estar relacionada (SAIF, 2004).

2.2 CORONAVÍRUS BOVINO

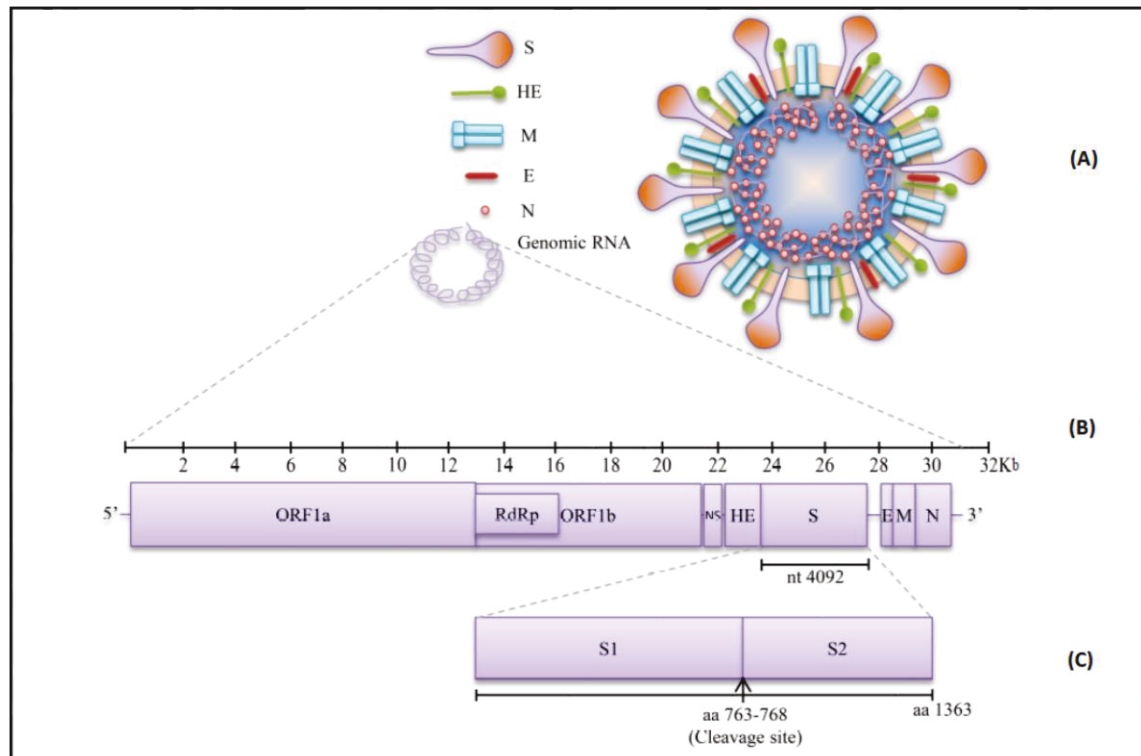
O Coronavírus Bovino (BCoV) é classificado em espécie-tipo dentro da espécie *Betacoronavirus tipo 1*, pertencente ao gênero *Betacoronavirus* e anteriormente classificado como grupo 2a. O BCoV está associado a diferentes síndromes em bovinos, como diarreia severa e aguda em bezerras, disenteria de inverno em gado adulto ou *winter dysentery* (WD) e infecção respiratória em bovinos de diferentes faixas etárias (DA SILVA et al., 1999; TAKIUCHI et al., 2009; TSUNEMITSU et al.,

1991). Uma vez que o BCoV pode ser detectado tanto em amostras do trato respiratório, como do trato intestinal de bovinos, a característica de duplo tropismo lhe é atribuída. As designações coronavírus bovino respiratório (BRCoV) e coronavírus bovino entérico (BECOV) são normalmente utilizadas para diferenciar os BCoV isolados do trato respiratório e intestinal, respectivamente (BOILEAU e KAPIL, 2010; PARK et al., 2007).

No terço final do genoma RNA de fita simples polaridade positiva, estão dispostos os genes codificantes das cinco proteínas estruturais do BCoV: HE, S, E, M e N (FIGURA 3) (LAI e CAVANAGH, 1997). Uma característica da replicação do BCoV é que, além da síntese de uma fita completa de RNA antígenômico (polaridade negativa), também são sintetizados múltiplos RNAsg que atuarão como RNAm das proteínas virais. A proteína N, constituinte do nucleocapsídeo helicoidal, é codificada por um gene altamente conservado entre os isolados de BCoV e a quantidade de RNAm_{sg} transcritos para esta proteína é muito superior às demais nas células infectadas (HISCOX, CAVANAGH e BRITTON, 1995).

Nas células infectadas pelo BCoV a proteína S é clivada por uma protease intracelular em duas subunidades, S1 (porção N-terminal) e S2 (porção C-terminal). O sinal de clivagem é constituído por uma sequência de aminoácidos básicos (KRRSRR) nos resíduos 763 a 768, ocorrendo a clivagem entre os aa 768 e 769 (STORZ, ROTT e KALUZA, 1981). A interação inicial da glicoproteína S com receptores celulares contendo resíduos 9-O-acetil de ácidos siálicos são determinantes para o tropismo tecidual e patogênese viral.

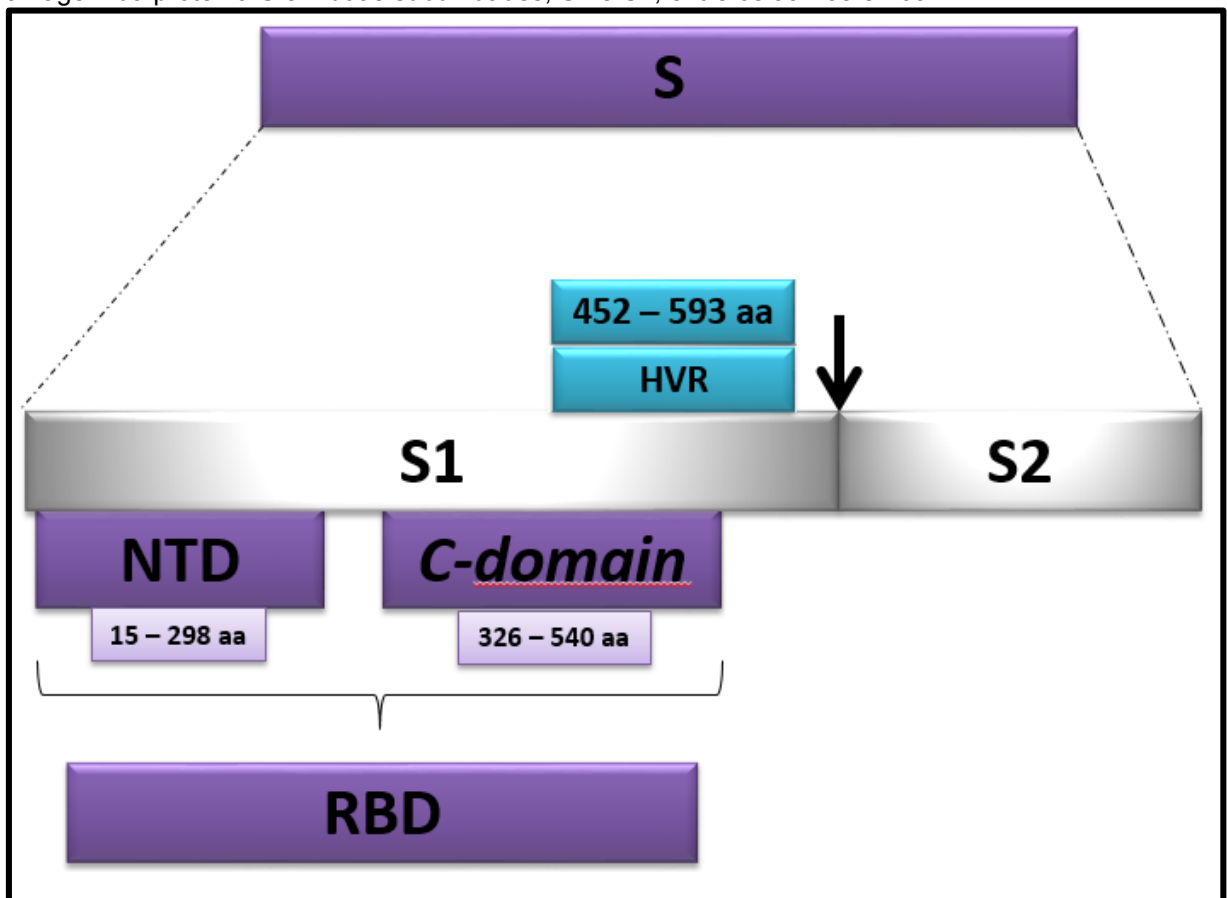
FIGURA 3 - Diagrama esquemático dos componentes do genoma do coronavírus bovino (BCoV). (A) Estrutura esquemática da partícula de BCoV com todos os componentes estruturais; (B) Organização do genoma do BCoV (os comprimentos estão simulados baseados nos tamanhos do gene correspondente); (C) Subunidades da glicoproteína de espícula (S); S1 e S2.



Fonte: adaptado de Bidokhti, 2013.

De ambos os produtos de clivagem da proteína do gene S do BCoV, a subunidade S2 é a mais conservada, diferente da subunidade S1, a qual demonstra maior variabilidade genética. Mutações entre as regiões RBD e HVR da subunidade S1 podem ter consequências na patogenicidade e antigenicidade do BCoV, justificando assim a diversidade de estudos moleculares que envolvem a proteína S1 (FIGURA 4) (HASOKSUZ et al., 2002b; REKIK e DEA, 1994).

FIGURA 4 - Desenho esquemático da glicoproteína S do BCoV, evidenciando a localização aproximada do domínio RBD e a região polimórfica, ou HVR, da subunidade S1. A flecha preta indica o sítio de clivagem da proteína S em duas subunidades, S1 e S2, entre os aa 768 e 769.



Fonte: o autor (2018).

2.2.1 Epidemiologia

Em 1972, o BCoV foi primeiramente reconhecido como causa de diarreia potencialmente fatal em bezerros e desde então, tem sido associado com casos de disenteria de inverno em bovinos adultos e diarreia neonatal (MEBUS et al., 1973; SMITH et al., 1996; TSUNEMITSU e SAIF, 1995; TSUNEMITSU et al., 1991). Em 1982 foi realizado o primeiro isolamento de BRCov de líquido de lavagens pulmonares e suabes nasofaríngeos decorrentes de dois surtos de pneumonia (THOMAS et al., 1982). Posteriormente, o BRCov foi detectado por diversos métodos diagnósticos, principalmente de amostras provenientes de suabe nasal (BEUTTEMULLER et al., 2017; CHO et al., 2001b; DA SILVA et al., 1999; DECARO et al., 2008a; FULTON, RIDPATH e BURGE, 2013; HASOKSUZ et al., 1999b; STORZ et al., 2000).

O BCoV está mundialmente difundido em rebanhos bovinos independente da aptidão, raça, idade e manejo (ABRAHAM, ROEDER e ZEWDU, 1992; DECARO et al., 2008c; FULTON et al., 2015; HAGGLUND et al., 2006; HICK et al., 2012; TAKIUCHI et al., 2006; TSUNEMITSU et al., 1991). A incidência sorológica acima de 90% sugere que a maioria do gado no mundo já esteve exposto ao vírus em alguma fase de sua vida, resultando em queda da produção de leite, perda de condição corporal e morte de animais jovens (BOILEAU e KAPIL, 2010; CLARK, 1993; SAIF, 2010). Em um estudo de sequenciamento metagenômico viral a partir de amostras de suabe nasal, a prevalência do BRCov foi de 24,7% em bovinos com e sem sinais de Doença Respiratória Bovina (DRB), no México e Estados Unidos (MITRA et al., 2016). No Brasil, existem diversos relatos do BCoV em diferentes estados como São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Paraná. No entanto, os estudos fundamentam-se geralmente em métodos moleculares ou sorológicos para detecção de BCoV em amostras de fezes, com taxas de infecção que variam entre 14 a 39% (ASANO et al., 2010; BARRY et al., 2009; BEZERRA JR et al., 2009; BRANDÃO et al., 2007; JEREZ et al., 2002; OLIVEIRA FILHO et al., 2007; STIPP et al., 2009; TAKIUCHI et al., 2009; TAKIUCHI et al., 2006). No entanto, há uma escassez de estudos de ocorrência de BCoV associado à doença respiratória no país, bem como a caracterização molecular e análise filogenética desses isolados (BEUTTEMULLER et al., 2017).

Atualmente, estudos incluindo o BRCov no Complexo Doença Respiratória Bovina (CDRB) são frequentes, com relatos de co-infecção com outros patógenos, como o vírus da Diarreia Viral Bovina (BVDV), Herpesvírus Bovino Tipo 1 (BoHV-1), Parainfluenza Bovina (PI-3), vírus Respiratório Sincicial Bovino (BRSV) e com algumas bactérias como *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Haemophilus somnus* e *Mycoplasma bovis*. Geralmente surtos dessa doença ocorrem após eventos estressantes como o desmame, mistura de animais, mudanças de dieta e principalmente após o transporte de bovinos a longas distâncias, sendo também conhecida como *shipping fever* ou febre do transporte (FULTON et al., 2011; HICK et al., 2012; LIN et al., 2000).

Em casos de doenças entéricas, principalmente em diarreias neonatais que possuem uma etiologia complexa e multifatorial, a ocorrência de BCoV geralmente é constatada juntamente com rotavírus bovino, norovírus e torovírus bovino. Observou-se também co-infecção com BVDV, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*,

Eimeria spp. e *Cryptosporidium parvum* (BARRY et al., 2009; CHO et al., 2013; HASCHEK et al., 2006).

Em um rebanho, os principais reservatórios para o BCoV podem ser os próprios bovinos jovens e adultos, clinicamente ou subcl clinicamente infectados (CROUCH et al., 1985; HECKERT et al., 1990). Sua transmissão ocorre via fecal-oral (BECOV) e potencialmente via aerossol (BRCOV) (SAIF, 2010).

A incidência da doença está relacionada principalmente à imunossupressão, seja decorrente do estresse ou más condições sanitárias e de manejo do rebanho. Um ambiente com alta densidade animal também favorece a transmissão animal-animal (OHLSON et al., 2010). O clima pode estar envolvido, uma que vez que a maior incidência da doença é observada nas estações frias e pode estar relacionada à estabilidade do envelope viral decorrente da baixa incidência da luz ultravioleta (UV) e baixa umidade. No entanto, alguns surtos já foram observados em estações quentes e com temperaturas estáveis (BIDOKHTI et al., 2012; DECARO et al., 2008c; PARK et al., 2006). De maneira geral, a coronavirose bovina, em infecções singulares, tem como característica a alta morbidade e baixa mortalidade em rebanhos suscetíveis. A mortalidade pode aumentar em casos de infecções mistas e em surtos agudos em rebanhos infectados (HICK et al., 2012). Em alguns casos observa-se a ocorrência de sinais respiratórios e entéricos concomitantes, com a detecção simultânea do BCoV em secreção nasal e fezes (DECARO et al., 2008a). Uma possível explicação é que após a replicação inicial na mucosa nasal, o BCoV se espalha para o trato gastrointestinal através da deglutição de grandes quantidades do vírus presentes na secreção, revestidos pelo muco. Após a ingestão, os bovinos com infecção respiratória poderiam então desenvolver sintomas gastrointestinais, como a diarreia (HASOKSUZ et al., 2002a; MARTÍNEZ et al., 2012; THOMAS et al., 2006).

2.2.2 Isolados entéricos e respiratórios

As primeiras indagações sobre o duplo tropismo do BCoV (entérico e respiratório) surgiram das constatações de que outros CoV podiam determinar infecções com manifestações respiratórias, como o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV), coronavírus murinho (MHV), vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV) e outros CoV que acometem humanos (STOTT et al., 1976; UNDERDAHL et al., 1974). Com isso, estudos *in vitro* para avaliar a patogenicidade e

possível afinidade do BCoV com o tecido respiratório foram desenvolvidos com êxito, além de diversas pesquisas subsequentes envolvendo animais *in vivo*, experimentais e em infecções naturais (CHO et al., 2001a; STORZ et al., 2000). Estudos preliminares demonstraram que alguns isolados de BRCov apresentavam características genéticas, patogênicas e antigênicas semelhantes aos isolados de BECoV (HASOKSUZ et al., 1999b; REYNOLDS et al., 1985; TSUNEMITSU et al., 1991; ZHANG et al., 1994a). Por outro lado, outros autores demonstraram que variações em tais aspectos ocorrem (CHOULJENKO et al., 1998; CHOULJENKO et al., 2001; HASOKSUZ et al., 1999a; LIN et al., 2000; LIN, O'REILLY e STORZ, 2002; ZHANG et al., 2007).

Embora diferenças genéticas entre amostras de BECoV e BRCov já tenham sido descritas, incluindo os isolados de um mesmo animal, o desafio *in vivo* demonstrou um alto nível de proteção cruzada entre ambos (CHO et al., 2001a; ZHANG et al., 2007). Utilizando ensaios de neutralização viral e inibição da hemaglutinação, Hasouksuz et al. (1999 a,b) demonstraram variações antigênicas entre os isolados de BECoV e BRCov. Porém, essas diferenças não puderam ser atribuídas exclusivamente à origem da amostra clínica.

Estudos com o propósito de verificar variações genéticas são frequentes, comparando cepas mais recentes de BRCov e BECoV com as cepas vacinais e protótipos (Mebus (BECoV), Quebec (BECoV), Kakegawa (WD), F15 (BECoV), LY138 (BECoV), OK-0514-3 (BRCov)), entre outras) (FULTON, RIDPATH e BURGE, 2013; GUNN et al., 2015; KANNO et al., 2009). Os isolados de BCoV contemporâneos tem apresentado diferenças quando comparados com as cepas protótipos, sugerindo uma deriva genética aleatória (variação alélica) e mudança de tropismo entérico para um duplo tropismo (entérico e respiratório) ao longo do tempo (KANNO et al., 2007; PARK et al., 2006). Nesse sentido, a divergência entre cepas pode ter consequências negativas na imunidade humoral induzida pela vacinação. No Brasil, as vacinas comerciais para BCoV utilizadas são formuladas em associação com outros patógenos entéricos e contém cepas protótipos como antígenos, como a cepa entérica Mebus. Logo, uma cobertura ineficaz para as cepas atualmente circulantes pode não oferecer a proteção esperada na imunização (BEUTTEMMULLER et al., 2017; FULTON et al., 2013).

No entanto, tais resultados podem ser de difícil interpretação, uma vez que as cepas foram isoladas há muitos anos e as pesquisas geralmente não comparam

isolados de uma única propriedade, região geográfica ou de um mesmo animal (HASOKSUZ et al., 2002b). Para definir os determinantes de tropismo tecidual de BECoV e BRCov com precisão, recomenda-se investigar os genomas completos de ambos isolados de um mesmo animal e proceder avaliações antes e depois da adaptação em cultivo celular (ZHANG et al., 2007).

Diferenças no tropismo celular já foram observadas em outras espécies de CoV, como o vírus da gastroenterite transmissível (TGEV) em suínos e coronavírus respiratório suíno (PRCV), que resultaram em diferentes apresentações clínicas. Ambos são patógenos que co-circulam em rebanhos suínos, sendo que o TGEV replica no trato entérico e o PRCV no trato respiratório. No caso desses patógenos, as variações do gene S foram responsáveis pela alteração de tropismo celular, já que o PRCV tem uma grande deleção na região 5' do gene S, indicando que o PRCV possa ser um mutante de deleção do TGEV (VAUGHN, HALBUR e PAUL, 1995).

A expansão e variação na gama de hospedeiros e tropismo tecidual dos CoV é em grande parte atribuível às mutações na glicoproteína S, principalmente na sub-unidade S1 (GALLAGHER e BUCHMEIER, 2001; GELINAS et al., 2001). Essas diferenças podem tanto mudar o dobramento da proteína, como suas características físico-químicas e antigênicas (HASOKSUZ et al., 2002b). Com a progressão da divergência genética na região polimórfica do gene S (HVR), sugere-se que a análise molecular com alvo nesta região seja útil para investigar a epidemiologia molecular e evolução genética do BCoV (KANNO et al., 2009).

No entanto, estudos anteriores envolvendo outras regiões do genoma, demonstraram a existência de variações em nucleotídeos na região genômica localizada na porção N-terminal da ORF2, que codifica uma proteína não estrutural de 32 kDa, altamente expressa em células infectadas com BCoV (COX, PARKER e BABIUK, 1991). Logo, mesmo que as diferenças encontradas pela análise de sequenciamento do gene S possam estar relacionadas com as mudanças nas propriedades patogênicas dos diferentes isolados de BCoV, essa região representa apenas um pequeno segmento do extenso genoma deste vírus. Deve-se considerar que tais variações entre cepas podem encontrar-se também em qualquer lugar do genoma, até mesmo em regiões não-codificantes (GELINAS et al., 2001). Assim, é provável que para o tropismo tecidual do BCoV, as mudanças sejam determinadas por múltiplos fatores envolvendo uma combinação de mutações genéticas em diversos resíduos ao longo de todo o genoma (ZHANG et al., 2007).

2.2.3 Diagnóstico

As manifestações clínicas decorrentes das infecções causadas pelo BRCov e BECoV são comuns a diversas outras patologias do trato respiratório e intestinal, respectivamente, inviabilizando um diagnóstico clínico conclusivo. Portanto, para o diagnóstico definitivo, é indispensável a investigação e identificação etiológica em amostras clínicas de animais com suspeita de coronavirose bovina.

Entretanto, as dificuldades em estabelecer e padronizar provas laboratoriais para detecção de BCoV são recorrentes, uma vez que infecções agudas têm uma curta duração de eliminação viral (3 a 6 dias). Ainda, a possibilidade de ocorrência de infecção subclínica com a eliminação de baixos títulos virais nas fases precoce e tardia de infecção constitui-se em dificuldades no diagnóstico laboratorial (BOILEAU e KAPIL, 2010; BORUCKI et al., 2013). Assim, devido à natureza transitória aguda das infecções causadas pelo BCoV, a coleta das amostras clínicas no início da doença ou pouco tempo depois é altamente recomendada. As taxas de detecção do BCoV e o período de tempo em que o mesmo é detectado em excreções e secreções ao longo do curso clínico da doença, são diretamente influenciadas pela sensibilidade dos testes diagnósticos (SAIF, 2010). Logo, é necessária a utilização de técnicas com alta sensibilidade e especificidade para estimar a real prevalência da infecção (TAKIUCHI et al., 2006).

Entre as amostras frequentemente coletadas de animais vivos para o diagnóstico laboratorial, incluem as secreções nasais e as fezes de bovinos clinicamente acometidos (CHO et al., 2001b). Além disso, amostras de lavados traqueobrônquias/bronco alveolares podem ser coletadas de bezerros vivos com doença respiratória aguda (SAIF, 2010). Para o diagnóstico anatomopatológico, tecidos do trato respiratório superior (nasal, faríngeo e traqueal), linfonodos retrofaríngeos e pulmão podem ser analisados; para avaliação do trato gastrointestinal, tecidos do intestino delgado distal, cólon e linfonodos mesentéricos constituem as amostras de eleição (OMA et al., 2016).

Os testes laboratoriais disponíveis para o diagnóstico das infecções pelo BCoV se baseiam principalmente na detecção de: (i) vírus ou do antígeno viral (microscopia eletrônica, isolamento viral em cultivo celular, imunofluorescência, imunohistoquímica, ELISA direto e teste de hemaglutinação) (REYNOLDS, 1983; SCHOENTHALER e KAPIL, 1999; STORZ et al., 2000; ZHANG et al., 1997).; (ii) RNA viral (RT-PCR e suas

variações) (DECARO et al., 2008b; TSUNEMITSU, SMITH e SAIF, 1999).; (iii) anticorpos neutralizantes (ELISA indireto, teste de inibição da hemaglutinação e soroneutralização) (LATHROP et al., 2000; PATON et al., 1998).

O isolamento viral em cultivo celular é considerado o padrão-ouro para a identificação e isolamento de diversos vírus (HSIUNG, 1984). Embora a morosidade e onerosidade da técnica inviabilize sua utilização na rotina diagnóstica para o BCoV, o método é útil para proceder estudos de caracterização genômica e antigênica de isolados selvagens (CLARK, 1993). Apesar da sua difícil adaptação a culturas celulares, o isolamento de BCoV já foi obtido em diversas linhagens. As células de adenocarcinoma retal humano (HRT-18) são amplamente empregadas pois demonstram permissividade, boa susceptibilidade e adaptação para BCoV (SAIF et al., 1988). Ainda que sejam células humanas de origem intestinal, as amostras de conteúdo respiratório (BRCov) também apresentaram replicação satisfatória nessas linhagens (TSUNEMITSU et al., 1991).

Durante a amplificação do BCoV em culturas celulares é típica a ausência de um efeito citopático (ECP) reconhecível ao longo das primeiras passagens (CLARK, 1993). Com a progressão das passagens o ECP torna-se mais evidente, podendo apresentar células granulares densas, arredondadas, largas e com formação de aglomerados de células (fusão), assemelhando-se a sincícios (BENFIELD e SAIF, 1990; CLARK, 1993; TSUNEMITSU e SAIF, 1995).

Os CoV, como outros vírus RNA, podem sofrer mutações espontaneamente durante passagens *in vitro* ou *in vivo* como resposta à adaptação a condições ambientais (LAI, ANDERSON e PERLMAN, 2007). A posterior análise das passagens em cultivo celular, por sequenciamento e filogenia molecular, é útil para avaliar as relações evolutivas e alterações genômicas resultantes de tal adaptação. Por outro lado, a propagação em cultivo celular e posteriores passagens podem afetar a real taxa de mutação, a composição antigênica e a atividade hemaglutinante do vírus (HUSSAIN, STORZ e KOUSOULAS, 1991; STORZ, ZHANG e ROTT, 1992). Assim, é igualmente importante analisar os genomas do RNA extraído diretamente das amostras clínicas (secreção nasal ou fezes), enquanto ainda não foram cultivadas, para proporcionar uma análise mais precisa dos genomas virais *in situ* e evitar tendências de mutação causadas durante a replicação viral *in vitro* (WOO et al., 2010). Estudos envolvendo regiões polimórficas do vírus, como a região HVR da subunidade

S1 da glicoproteína S após passagens em cultivo celular, são frequentemente descritos (CHOULJENKO et al., 1998; HASOKSUZ et al., 2002b).

Em um estudo conduzido por Zhang et al., (2007), pela análise do genoma completo, verificaram que após 15 passagens em cultura celular de uma cepa de campo entérica, esta apresentou 104 mutações, sendo que 86 dessas resultaram em nucleotídeos semelhantes a uma amostra biológica respiratória (sem passagem em cultivo) do mesmo animal. Com isso, sugere-se que um processo evolutivo similar possa ter ocorrido *in vitro* durante a adaptação do BCoV no cultivo celular, assim como ocorre *in vivo* durante a adaptação para o duplo tropismo (entérico ao respiratório).

Devido à maior sensibilidade, especificidade e versatilidade, métodos que se baseiam na amplificação do material genético conservado, como a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), têm sido amplamente descritos e utilizados para detecção de BCoV. A aplicação da RT-PCR, *Semi-Nested* PCR (SN-PCR), *Nested*-PCR (N-PCR) e PCR quantitativo ou em tempo real (q-PCR) em amostras fecais e respiratórias são úteis na detecção de pequenas quantidades de ácido nucleico, no início ou final da infecção, quando os animais podem apresentar baixa eliminação viral transitória (CHO et al., 2001a; DECARO et al., 2008a; DECARO et al., 2008b; TAKIUCHI et al., 2006; TSUNEMITSU, SMITH e SAIF, 1999).

No entanto, existem diversos fatores que podem inibir a amplificação eficaz dos ácidos nucleicos. A presença de contaminantes (inibidores) pode interferir diretamente na lise celular necessária para a extração de DNA, além de contribuir para a degradação dos ácidos nucleicos de interesse e inibir a atividade da enzima polimerase para amplificação do DNA alvo. Quanto à natureza da amostra biológica, a detecção do BCoV nas fezes é mais dificultosa. A presença abundante de enzimas proteolíticas, nucleases bacterianas, debris celulares, ácidos biliares e outros fatores comumente presentes nas fezes, podem impedir a amplificação e consequentemente inativar a atividade da polimerase (WILSON, 1997). Para isso é essencial a otimização dos protocolos de extração do ácido nucleico a partir de amostras entéricas para a obtenção de RNA viral mais puro e em maior concentração (TAKIUCHI et al., 2006).

Outros fatores que podem prejudicar o diagnóstico são inerentes do próprio agente etiológico. O extenso genoma RNA ($\approx 30\text{kb}$) do BCoV pode contribuir para a formação de estruturas secundárias e interferir na efetiva transcrição das cópias de cDNA, além das altas taxas de erro da RdRp viral que pode acumular várias substituições de base por ciclo de replicação (DENISON et al., 2011; JARVIS e

KIRKEGAARD, 1991). Além disso, a alta taxa de recombinação (*copy-choice*) que favorecem o aparecimento de mutações e a alta variabilidade de cepas dos CoV, também são identificadas como fatores limitantes para a eficácia da amplificação de seu RNA genômico por RT-PCR (DECARO et al., 2008b; DENISON et al., 2011; FU e BARIC, 1992).

Contrariamente aos estudos de variabilidade genética, os estudos que envolvem a prevalência da doença devem selecionar uma região mais conservada do genoma BCoV. O gene que codifica a proteína N é o mais abundante nas células infectadas na forma de RNAs e também é altamente conservado entre os isolados de BCoV. Assim, pela abundância de RNA derivado da proteína N na infecção, somada a conservação do gene, sua detecção em estudos de prevalência é comumente realizada (BARIC et al., 1988; NARAYANAN et al., 2000).

2.3 REFERÊNCIAS – REVISÃO DE LITERATURA

- ABRAHAM, G.; ROEDER, P. L.; ZEWDU, R. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. **Tropical animal health and production**, v. 24, n. 2, p. 74-80, 1992.
- ASANO, K. M.; DE SOUZA, S. P.; DE BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal of virological methods**, v. 169, n. 2, p. 375-379, 2010.
- BALLESTEROS, M. L.; SANCHEZ, C. M.; ENJUANES, L. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. **Virology**, v. 227, n. 2, p. 378-388, 1997.
- BARIC, R. S.; NELSON, G. W.; FLEMING, J. O.; DEANS, R. J.; KECK, J. G.; CASTEEL, N.; STOHLMAN, S. A. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. **Journal of Virology**, v. 62, n. 11, p. 4280-4287, 1988.
- BARIC, R. S.; FU, K.; CHEN, W.; YOUNT, B. High recombination and mutation rates in mouse hepatitis virus suggest that coronaviruses may be potentially important emerging viruses. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 380, p. 571-576, 1995.
- BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. A. Bovine coronavirus detection in a collection of diarrheic stool samples positive for group a bovine rotavirus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. SPE, p. 45-49, 2009.
- BELOUZARD, S.; MILLET, J. K.; LICITRA, B. N.; WHITTAKER, G. R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011-1033, 2012.
- BENFIELD, D. A.; SAIF, L. J. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1454-1457, 1990.
- BEUTTEMULLER, E. A.; ALFIERI, A. F.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. Brazilian strain of bovine respiratory coronavirus is derived from dual enteric and respiratory tropism. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 16, n. 2, 2017.
- BEZERRA JR, P. S.; BRANDÃO, P. E.; PAVARINI, S. P.; VARASCHIN, M. S.; WOUTERS, F.; VILLARREAL, L. Y. B.; JEREZ, J. A.; COSTA, G. M. Surto de diarreia em vacas de um rebanho leiteiro na região sul de Minas Gerais: detecção de coronavírus bovino nas fezes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 992-995, 2009.

BIDOKHTI, M. R. **Epidemiology and Molecular Tracing of Bovine Coronavirus and Bovine Respiratory Syncytial Virus Infections in Cattle Herds**. Tese (Doutorado) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Clinical Sciences, Uppsala, Suécia, 2013.

BIDOKHTI, M. R.; TRAVEN, M.; OHLSON, A.; BAULE, C.; HAKHVERDYAN, M.; BELAK, S.; LIU, L.; ALENIUS, S. Tracing the transmission of bovine coronavirus infections in cattle herds based on S gene diversity. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 193, n. 2, p. 386-390, 2012.

BOILEAU, M. J.; KAPIL, S. Bovine coronavirus associated syndromes. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 1, p. 123-146, table of contents, 2010.

BORUCKI, M. K.; ALLEN, J. E.; CHEN-HARRIS, H.; ZEMLA, A.; VANIER, G.; MABERY, S.; TORRES, C.; HULLINGER, P.; SLEZAK, T. The role of viral population diversity in adaptation of bovine coronavirus to new host environments. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e52752, 2013.

BRANDÃO, P. E.; VILLARREAL, L. Y. B.; SOUZA, S. L. P. D.; RICHTZENHAIN, L. J.; JEREZ, J. A. Mixed infections by bovine coronavirus, rotavirus, and *Cryptosporidium parvum* in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 33-34, 2007.

CHO, K. O.; HASOKSUZ, M.; NIELSEN, P. R.; CHANG, K. O.; LATHROP, S.; SAIF, L. J. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. **Archives of virology**, v. 146, n. 12, p. 2401-2419, 2001a.

CHO, K. O.; HOET, A. E.; LOERCH, S. C.; WITTUM, T. E.; SAIF, L. J. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. **American journal of veterinary research**, v. 62, n. 9, p. 1436-1441, 2001b.

CHO, Y. I.; HAN, J. I.; WANG, C.; COOPER, V.; SCHWARTZ, K.; ENGELKEN, T.; YOON, K. J. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 375-385, 2013.

CHOULJENKO, V. N.; KOUSOULAS, K. G.; LIN, X.; STORZ, J. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. **Virus genes**, v. 17, n. 1, p. 33-42, 1998.

CHOULJENKO, V. N.; LIN, X. Q.; STORZ, J.; KOUSOULAS, K. G.; GORBALENYA, A. E. Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. **The Journal of general virology**, v. 82, n. Pt 12, p. 2927-2933, 2001.

CLARK, M. A. Bovine coronavirus. **The British veterinary journal**, v. 149, n. 1, p. 51-70, 1993.

COX, G. J.; PARKER, M. D.; BABIUK, L. A. Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 509-512, 1991.

CROUCH, C. F.; OHMANN, H. B.; WATTS, T. C.; BABIUK, L. A. Chronic Shedding of Bovine Enteric Coronavirus Antigen-Antibody Complexes by Clinically Normal Cows. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 7, p. 1489-1500, 1985.

DA SILVA, M. R.; O'REILLY, K. L.; LIN, X.; STINE, L.; STORZ, J. Sensitivity comparison for detection of respiratory bovine coronaviruses in nasal samples from feedlot cattle by ELISA and isolation with the G clone of HRT-18 cells. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 1999.

DE GROOT, R. J.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; BROWN, C. S.; DROSTEN, C.; ENJUANES, L.; FOUCHIER, R. A. M.; GALIANO, M.; GORBALENYA, A. E.; MEMISH, Z. A.; PERLMAN, S.; POON, L. L. M.; SNIJDER, E. J.; STEPHENS, G. M.; WOO, P. C. Y.; ZAKI, A. M.; ZAMBON, M.; ZIEBUHR, J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of Virology**, v. 87, n. 14, p. 7790-7792, 2013.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; CIRONE, F.; D'ABRAMO, M.; LORUSSO, E.; GRECO, G.; MARI, V.; COLAIANNI, M. L.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 20, n. 1, p. 28-32, 2008a.

DECARO, N.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; MARI, V.; RADOGNA, A.; COLAIANNI, M. L.; CIRONE, F.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. **Journal of virological methods**, v. 151, n. 2, p. 167-171, 2008b.

DECARO, N.; MARI, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; GRECO, G.; CIRONE, F.; COLAIANNI, M. L.; CORDIOLI, P.; BUONAVOGLIA, C. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. **Veterinary microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 30-39, 2008c.

DENISON, M. R.; GRAHAM, R. L.; DONALDSON, E. F.; ECKERLE, L. D.; BARIC, R. S. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. **RNA biology**, v. 8, n. 2, p. 270-279, 2011.

ENJUANES, L.; ZUÑIGA, S.; CASTAÑO-RODRIGUEZ, C.; GUTIERREZ-ALVAREZ, J.; CANTON, J.; SOLA, I. Chapter Eight - Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. In: J. Ziebuhr (Ed.). **Advances in virus research**. Academic Press, 2016. 245-286.

ERLES, K.; TOOMEY, C.; BROOKS, H. W.; BROWNLIE, J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. **Virology**, v. 310, n. 2, p. 216-223, 2003.

FISCHER, F.; PENG, D.; HINGLEY, S. T.; WEISS, S. R.; MASTERS, P. S. The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. **Journal of Virology**, v. 71, n. 2, p. 996-1003, 1997.

FU, K.; BARIC, R. S. Evidence for variable rates of recombination in the MHV genome. **Virology**, v. 189, n. 1, p. 88-102, 1992.

FULTON, R. W.; STEP, D. L.; WAHRMUND, J.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E.; COOK, B. J.; BURKEN, D.; RICHARDS, C. J.; CONFER, A. W. Bovine coronavirus (BCV) infections in transported commingled beef cattle and sole-source ranch calves. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, v. 75, n. 3, p. 191-199, 2011.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J. Bovine coronaviruses from the respiratory tract: antigenic and genetic diversity. **Vaccine**, v. 31, n. 6, p. 886-892, 2013.

FULTON, R. W.; HERD, H. R.; SORENSEN, N. J.; CONFER, A. W.; RITCHEY, J. W.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J. Enteric disease in postweaned beef calves associated with Bovine coronavirus clade 2. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 27, n. 1, p. 97-101, 2015.

GALLAGHER, T. M.; BUCHMEIER, M. J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. **Virology**, v. 279, n. 2, p. 371-374, 2001.

GELINAS, A. M.; BOUTIN, M.; SASSEVILLE, A. M.; DEA, S. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. **Virus research**, v. 76, n. 1, p. 43-57, 2001.

GORBALENYA, A. E.; ENJUANES, L.; ZIEBUHR, J.; SNIJDER, E. J. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. **Virus research**, v. 117, n. 1, p. 17-37, 2006.

GRAHAM, R. L.; BARIC, R. S. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. **Journal of Virology**, v. 84, n. 7, p. 3134-3146, 2010.

GUNN, L.; COLLINS, P. J.; O'CONNELL, M. J.; O'SHEA, H. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. **Irish veterinary journal**, v. 68, p. 31, 2015.

- HAGGLUND, S.; SVENSSON, C.; EMANUELSON, U.; VALARCHER, J. F.; ALENIUS, S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 172, n. 2, p. 320-328, 2006.
- HASCHEK, B.; KLEIN, D.; BENETKA, V.; HERRERA, C.; SOMMERFELD-STUR, I.; VILCEK, S.; MOESTL, K.; BAUMGARTNER, W. Detection of bovine torovirus in neonatal calf diarrhoea in Lower Austria and Styria (Austria). **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 53, n. 4, p. 160-165, 2006.
- HASOKSUZ, M.; LATHROP, S.; AL-DUBAIB, M. A.; LEWIS, P.; SAIF, L. J. Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 144, n. 12, p. 2441-2447, 1999a.
- HASOKSUZ, M.; LATHROP, S. L.; GADFIELD, K. L.; SAIF, L. J. Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 10, p. 1227-1233, 1999b.
- HASOKSUZ, M.; HOET, A. E.; LOERCH, S. C.; WITTUM, T. E.; NIELSEN, P. R.; SAIF, L. J. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 14, n. 4, p. 308-313, 2002a.
- HASOKSUZ, M.; SREEVATSAN, S.; CHO, K. O.; HOET, A. E.; SAIF, L. J. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. **Virus research**, v. 84, n. 1-2, p. 101-109, 2002b.
- HASOKSUZ, M.; ALEKSEEV, K.; VLASOVA, A.; ZHANG, X.; SPIRO, D.; HALPIN, R.; WANG, S.; GHEDIN, E.; SAIF, L. J. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. **Journal of Virology**, v. 81, n. 10, p. 4981-4990, 2007.
- HECKERT, R. A.; SAIF, L. J.; HOBLET, K. H.; AGNES, A. G. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. **Veterinary microbiology**, v. 22, n. 2-3, p. 187-201, 1990.
- HICK, P. M.; READ, A. J.; LUGTON, I.; BUSFIELD, F.; DAWOOD, K. E.; GABOR, L.; HORNITZKY, M.; KIRKLAND, P. D. Coronavirus infection in intensively managed cattle with respiratory disease. **Australian veterinary journal**, v. 90, n. 10, p. 381-386, 2012.
- HISCOX, J. A.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Quantification of individual subgenomic mRNA species during replication of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. **Virus research**, v. 36, n. 2-3, p. 119-130, 1995.

HSIUNG, G. D. Diagnostic virology: from animals to automation. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 57, n. 5, p. 727-733, 1984.

HUSSAIN, K. A.; STORZ, J.; KOUSOULAS, K. G. Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike glycoprotein distinguish between vaccine and wild-type strains. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 442-445, 1991.

ICTV. 2017. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2017 release. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: March, 20, 2018.

JARVIS, T. C.; KIRKEGAARD, K. The polymerase in its labyrinth: mechanisms and implications of RNA recombination. **Trends in genetics : TIG**, v. 7, n. 6, p. 186-191, 1991.

JEREZ, J. A.; BRANDÃO, P. E.; BUZINARO, M. G.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 19-23, 2002.

KANNO, T.; HATAMA, S.; ISHIHARA, R.; UCHIDA, I. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. **The Journal of general virology**, v. 88, n. Pt 4, p. 1218-1224, 2007.

KANNO, T.; KAMIYOSHI, T.; ISHIHARA, R.; HATAMA, S.; UCHIDA, I. Phylogenetic studies of bovine coronaviruses isolated in Japan. **The Journal of veterinary medical science**, v. 71, n. 1, p. 83-86, 2009.

KECK, J. G.; HOGUE, B. G.; BRIAN, D. A.; LAI, M. M. C. Temporal regulation of bovine coronavirus RNA synthesis. **Virus research**, v. 9, n. 4, p. 343-356, 1988.

LAI, M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in virus research**, v. 48, p. 1-100, 1997.

LAI, M. M.; ANDERSON, L. J.; PERLMAN, S. Coronaviridae. In: B. N. Fields; D. M. Knipe; P. M. Howley (Ed.). **Fields Virology**. 2007. 1305 - 1335.

LATHROP, S. L.; WITTUM, T. E.; LOERCH, S. C.; PERINO, L. J.; SAIF, L. J. Antibody titers against bovine coronavirus and shedding of the virus via the respiratory tract in feedlot cattle. **American journal of veterinary research**, v. 61, n. 9, p. 1057-1061, 2000.

LI, F. Evidence for a Common Evolutionary Origin of Coronavirus Spike Protein Receptor-Binding Subunits. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2856-2858, 2012.

LI, F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. **Antiviral research**, v. 100, n. 1, p. 246-254, 2013.

LI, F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. **Journal of Virology**, v. 89, n. 4, p. 1954-1964, 2015.

- LI, W.; WONG, S. K.; LI, F.; KUHN, J. H.; HUANG, I. C.; CHOE, H.; FARZAN, M. Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: insight from ACE2-S-protein interactions. **Journal of Virology**, v. 80, n. 9, p. 4211-4219, 2006.
- LIM, K. P.; LIU, D. X. The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17515-17523, 2001.
- LIN, X. Q.; KL, O. E.; STORZ, J.; PURDY, C. W.; LOAN, R. W. Antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle during shipping fever pathogenesis. **Archives of virology**, v. 145, n. 11, p. 2335-2349, 2000.
- LIN, X. Q.; O'REILLY, K. L.; STORZ, J. Antibody responses of cattle with respiratory coronavirus infections during pathogenesis of shipping fever pneumonia are lower with antigens of enteric strains than with those of a respiratory strain. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 1010-1013, 2002.
- LIU, L.; HAGGLUND, S.; HAKHVERDYAN, M.; ALENIUS, S.; LARSEN, L. E.; BELAK, S. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 957-960, 2006.
- MARTÍNEZ, N.; BRANDÃO, P. E.; DE SOUZA, S. P.; BARRERA, M.; SANTANA, N.; DE ARCE, H. D.; PÉREZ, L. J. Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1870-1878, 2012.
- MCBRIDE, R.; VAN ZYL, M.; FIELDING, B. C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2991-3018, 2014.
- MEBUS, C. A.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. **Veterinary pathology**, v. 10, n. 1, p. 45-64, 1973.
- MILLET, J. K.; WHITTAKER, G. R. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. **Virus research**, v. 202, p. 120-134, 2015.
- MITRA, N.; CERNICCHIARO, N.; TORRES, S.; LI, F.; HAUSE, B. M. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. **Journal of General Virology**, v. 97, p. 1771-1784, 2016.
- NARAYANAN, K.; MAEDA, A.; MAEDA, J.; MAKINO, S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 8127-8134, 2000.
- NEUMAN, B. W.; KISS, G.; KUNDING, A. H.; BHELLA, D.; BAKSH, M. F.; CONNELLY, S.; DROESE, B.; KLAUS, J. P.; MAKINO, S.; SAWICKI, S. G.;

SIDDELL, S. G.; STAMOU, D. G.; WILSON, I. A.; KUHN, P.; BUCHMEIER, M. J. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of structural biology**, v. 174, n. 1, p. 11-22, 2011.

OHLSON, A.; HEUER, C.; LOCKHART, C.; TRAVEN, M.; EMANUELSON, U.; ALENIUS, S. Risk factors for seropositivity to bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus in dairy herds. **The Veterinary record**, v. 167, n. 6, p. 201-206, 2010.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P. G.; PACHECO, M. D.; MASCARINI, L. M.; RIBEIRO, M. G.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; BARROS, B. J. P.; BORGES, A. S. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 419-424, 2007.

OMA, V. S.; TRAVEN, M.; ALENIUS, S.; MYRMEL, M.; STOKSTAD, M. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. **Virology journal**, v. 13, p. 100, 2016.

PARK, S. J.; JEONG, C.; YOON, S. S.; CHOY, H. E.; SAIF, L. J.; PARK, S. H.; KIM, Y. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; LEE, B. J.; CHO, H. S.; KIM, S. K.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3178-3188, 2006.

PARK, S. J.; KIM, G. Y.; CHOY, H. E.; HONG, Y. J.; SAIF, L. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; KIM, S. K.; SHIN, S. S.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. **Archives of virology**, v. 152, n. 10, p. 1885-1900, 2007.

PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K. H.; ALENIUS, S.; CRANWELL, M. P.; PRITCHARD, G. C.; DREW, T. W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **The Veterinary record**, v. 142, n. 15, p. 385-391, 1998.

RAAMSMAN, M. J.; LOCKER, J. K.; DE HOOGE, A.; DE VRIES, A. A.; GRIFFITHS, G.; VENNEMA, H.; ROTTIER, P. J. Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. **Journal of Virology**, v. 74, n. 5, p. 2333-2342, 2000.

REKIK, M. R.; DEA, S. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. **Archives of virology**, v. 135, n. 3-4, p. 319-331, 1994.

REYNOLDS, D. J. Coronavirus replication in the intestinal and respiratory tracts during infection of calves. **Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research**, v. 14, n. 4, p. 445-446, 1983.

REYNOLDS, D. J.; DEBNEY, T. G.; HALL, G. A.; THOMAS, L. H.; PARSONS, K. R. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. **Archives of virology**, v. 85, n. 1-2, p. 71-83, 1985.

SAIF, L. J.; HECKERT, R. A.; MILLER, K. L.; TAREK, M. M. Cell culture propagation of bovine coronavirus. **Journal of tissue culture methods**, v. 11, n. 3, p. 139-145, 1988.

SAIF, L. J. ANIMAL CORONAVIRUSES: LESSONS FOR SARS. In: M. A. Knobler S, Lemon S, et al. (Ed.). **Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak: Workshop Summary**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2004.

SAIF, L. J. Comparative Biology of Animal Coronaviruses: Lessons for SARS. In: M. Peiris; L. J. Anderson; A. D. Osterhaus; K. Stohr; K. y. Yuen (Ed.). **Severe Acute Respiratory Syndrome**. 2008.

SAIF, L. J. Bovine respiratory coronavirus. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 349-364, 2010.

SCHOENTHALER, S. L.; KAPIL, S. Development and applications of a bovine coronavirus antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 6, n. 1, p. 130-132, 1999.

SENANAYAKE, S. D.; BRIAN, D. A. Bovine coronavirus I protein synthesis follows ribosomal scanning on the bicistronic N mRNA. **Virus research**, v. 48, n. 1, p. 101-105, 1997.

SMITH, D. R.; TSUNEMITSU, H.; HECKERT, R. A.; SAIF, L. J. Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of bovine coronavirus. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 8, n. 1, p. 99-105, 1996.

SMITH, E. C.; DENISON, M. R. Coronaviruses as DNA wannabes: a new model for the regulation of RNA virus replication fidelity. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003760, 2013.

SMITH, E. C.; SEXTON, N. R.; DENISON, M. R. Thinking Outside the Triangle: Replication Fidelity of the Largest RNA Viruses. **Annual review of virology**, v. 1, n. 1, p. 111-132, 2014.

STIPP, D. T.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; TAKIUCHI, E.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. **Tropical animal health and production**, v. 41, n. 7, p. 1563-1567, 2009.

STORZ, J.; ROTT, R.; KALUZA, G. Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. **Infect Immun**, v. 31, n. 3, p. 1214-1222, 1981.

STORZ, J.; ZHANG, X. M.; ROTT, R. Comparison of hemagglutinating, receptor-destroying, and acetylsterase activities of avirulent and virulent bovine coronavirus strains. **Archives of Virology**, v. 125, n. 1, p. 193-204, 1992.

STORZ, J.; PURDY, C. W.; LIN, X.; BURRELL, M.; TRUAX, R. E.; BRIGGS, R. E.; FRANK, G. H.; LOAN, R. W. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytotoxic viruses, and *Pasteurella* spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 10, p. 1599-1604, 2000.

STOTT, E. J.; THOMAS, L. H.; BRIDGER, J. C.; JEBBETT, N. J. Replication of a bovine coronavirus in organ cultures of foetal trachea. **Veterinary Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 65-69, 1976.

TAKIUCHI, E.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. **Journal of virological methods**, v. 131, n. 2, p. 148-154, 2006.

TAKIUCHI, E.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; FILIPPSEN, P.; ALFIERI, A. A. An outbreak of winter dysentery caused by bovine coronavirus in a high-production dairy cattle herd from a tropical country. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 57-61, 2009.

THOMAS, C. J.; HOET, A. E.; SREEVATSAN, S.; WITTUM, T. E.; BRIGGS, R. E.; DUFF, G. C.; SAIF, L. J. Transmission of bovine coronavirus and serologic responses in feedlot calves under field conditions. **American journal of veterinary research**, v. 67, n. 8, p. 1412-1420, 2006.

THOMAS, L. H.; GOURLAY, R. N.; STOTT, E. J.; HOWARD, C. J.; BRIDGER, J. C. A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves. **Research in veterinary science**, v. 33, n. 2, p. 170-182, 1982.

TSUNEMITSU, H.; YONEMICHI, H.; HIRAI, T.; KUDO, T.; ONOE, S.; MORI, K.; SHIMIZU, M. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. **The Journal of veterinary medical science**, v. 53, n. 3, p. 433-437, 1991.

TSUNEMITSU, H.; EL-KANAWATI, Z. R.; SMITH, D. R.; REED, H. H.; SAIF, L. J. Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3264-3269, 1995.

TSUNEMITSU, H.; SAIF, L. J. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. **Archives of virology**, v. 140, n. 7, p. 1303-1311, 1995.

TSUNEMITSU, H.; SMITH, D. R.; SAIF, L. J. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. **Archives of virology**, v. 144, n. 1, p. 167-175, 1999.

UJIKE, M.; TAGUCHI, F. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1700-1725, 2015.

UNDERDAHL, N. R.; MEBUS, C. A.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; MCGILL, L. D.; TWIEHAUS, M. J. Isolation of transmissible gastroenteritis virus from lungs of market-weight swine. **American journal of veterinary research**, v. 35, n. 9, p. 1209-1216, 1974.

VAUGHN, E. M.; HALBUR, P. G.; PAUL, P. S. Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 5, p. 3176-3184, 1995.

VIJGEN, L.; KEYAERTS, E.; MOES, E.; THOELLEN, I.; WOLLANTS, E.; LEMEY, P.; VANDAMME, A. M.; VAN RANST, M. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. **Journal of Virology**, v. 79, n. 3, p. 1595-1604, 2005.

VIPR. 2018. Virus Pathogen Database and Analysis Resource. Disponível em: <https://www.viprbrc.org/brc/vipr_allSpecies_search.spg?method=SubmitForm&decorator=corona>. Acesso em: March, 20, 2018.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; YIP, C. C.; HUANG, Y.; TSOI, H. W.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 7136-7145, 2006.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; LAM, C. S.; LAI, K. K.; HUANG, Y.; LEE, P.; LUK, G. S.; DYRTING, K. C.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. **Journal of Virology**, v. 83, n. 2, p. 908-917, 2009.

WOO, P. C.; HUANG, Y.; LAU, S. K.; YUEN, K. Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1804-1820, 2010.

ZHANG, X.; HERBST, W.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Comparison of the S genes and the biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. **Archives of virology**, v. 134, n. 3-4, p. 421-426, 1994a.

ZHANG, X.; HASOKSUZ, M.; SPIRO, D.; HALPIN, R.; WANG, S.; VLASOVA, A.; JANIES, D.; JONES, L. R.; GHEDIN, E.; SAIF, L. J. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. **Virology**, v. 363, n. 1, p. 1-10, 2007.

ZHANG, X. M.; HERBST, W.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. **Journal of medical virology**, v. 44, n. 2, p. 152-161, 1994b.

ZHANG, Z.; ANDREWS, G. A.; CHARD-BERGSTROM, C.; MINOCHA, H. C.; KAPIL, S. Application of immunohistochemistry and in situ hybridization for detection of bovine coronavirus in paraffin-embedded, formalin-fixed intestines. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2964-2965, 1997.

ZIEBUHR, J. The coronavirus replicase. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 287, p. 57-94, 2005.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de coronavírus bovino (BCoV) associado à doença respiratória em bezerros e caracterizar molecularmente os isolados de BCoV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o BCoV em amostras de secreção nasal e fezes utilizando a *Semi-Nested* RT-PCR para amplificação parcial do gene N;
- Isolar o BCoV em células HRT-18 a partir das amostras biológicas triadas como positivas pela *Semi-Nested* RT-PCR;
- Amplificar uma sequência parcial do gene S do BCoV diretamente de amostra clínica e dos isolados em cultivo celular;
- Utilizar a RT-PCR para amplificação parcial do gene S e comparar molecularmente as sequências obtidas diretamente da amostra clínica e dos isolados em cultivo celular;
- Estabelecer as relações filogenéticas entre as cepas brasileiras de BCoV com os isolados de BCoV de diferentes regiões geográficas e isolados ancestrais.

4 CAPÍTULO 1 – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DA GLICOPROTEÍNA S DE CORONAVÍRUS BOVINO ASSOCIADO À DOENÇA RESPIRATÓRIA

RESUMO:

O coronavírus bovino (BCoV) é um vírus com duplo tropismo (entérico e respiratório) e desencadeia manifestações clínicas entéricas e respiratórias nos bovinos, em doenças como a disenteria de inverno (*winter dysentery*) em bovinos adultos, diarreia neonatal em bezerros e doença respiratória. O presente trabalho reporta a detecção de BCoV associado à doença respiratória em animais jovens e descreve a análise molecular e filogenética do isolado respiratório (BOV19-NS) com base em fragmentos parciais (1447 nt e 438 nt) do gene S. O trabalho também descreve o sucesso do isolamento da BOV19-NS em células da linhagem HRT-18 e compara molecularmente as sequências do gene da glicoproteína S do BCoV obtidas diretamente da amostra clínica e do isolado adaptado ao longo das passagens celulares. A matriz de identidade do fragmento maior (1447 nt) demonstrou maior identidade (98,2%) da amostra BOV19-NS com isolados brasileiros de BCoV, coletados em 2004, no estado de Minas Gerais (BRUEL-1, BRUEL-2 e BRUEL-3), enquanto do fragmento menor (438) a maior identidade (98,4%) foi observada com um isolado brasileiro de BCoV coletado em 2014 no Rio de Janeiro (PD1). A árvore filogenética demonstrou uma tendência de separação filogeográfica dos isolados de BCoV. Comparando com o protótipo ancestral de BCoV, cepa Mebus, foram identificadas 33 substituições nucleotídicas, das quais 15 resultaram em mutações não sinônimas (9 transições e 6 transversões). Uma alteração de aa inédita foi detectada no resíduo 528 (Ala528→Val) da região hipervariável da S1 em um isolado selvagem. Em comparação com a amostra selvagem, foi identificada apenas uma substituição nucleotídica na posição de nt 2428 (AAT→TAT) a partir da 7ª passagem, que resultou na transversão, carga neutra-neutra, Asn810→Tyr. Este é o primeiro relato de isolamento de BCoV em cultivo celular associado à doença respiratória no Brasil. Além disso é pioneiro na caracterização molecular do isolado selvagem e do respectivo adaptado em cultivo após sucessivas passagens.

Palavras-chave: Caracterização molecular, coronavírus bovino, filogenia, gene S, isolamento.

4.1 INTRODUÇÃO

O coronavírus bovino (BCoV) é um vírus RNA de polaridade positiva e fita simples (ssRNA), pertencente à família *Nidovirales*, gênero *Betacoronavirus* grupo A. As infecções pelo BCoV estão associadas às manifestações clínicas entéricas e respiratórias nos bovinos, como a disenteria de inverno ou *winter dysentery* (WD) em bovinos adultos, diarreia neonatal em bezerros e doença respiratória em bovinos de diversas faixas etárias. Os isolados de BCoV do trato respiratório e entérico são comumente designados de coronavírus bovino respiratório (BRCoV) e coronavírus bovino entérico (BECoV) (BOILEAU e KAPIL, 2010; PARK et al., 2007).

O genoma do BCoV codifica cinco principais proteínas estruturais: a proteína do nucleocapsídeo (N), transmembrana (M), hemaglutinina/esterase (HE), a proteína de espícula ou *spike* (S) e de membrana pequena ou envelope (E), além de várias proteínas não-estruturais (nsps). A proteína do nucleocapsídeo (N) é altamente conservada entre os isolados de BCoV, consistindo num dos principais alvos para proceder o diagnóstico molecular. Além disso, os RNAm subgenômicos (RNAm_{sg}) transcritos para essa proteína são os mais abundantes nas células infectadas (BARIC et al., 1988; NARAYANAN et al., 2000).

Já a proteína S, uma glicoproteína do tipo 1, forma peplômeros ou espículas de superfície com receptores celulares específicos, sendo o principal alvo de anticorpos neutralizantes, apresentando diversas funções na interação vírus-hospedeiro (CAVANAGH, 1995). A proteína S é clivada em subunidades S1 e S2 por proteases durante o processamento no Complexo de Golgi. Na subunidade S1, os domínios N-terminal e C-terminal são responsáveis pela ligação aos receptores das células hospedeiras, ou também denominados de Domínio de Ligação ao Receptor Celular (RBD), localizado aproximadamente entre os resíduos de aminoácidos (aa) 15 a 298 e 326 a 540 no BCoV (BIDOKHTI et al., 2013; PENG et al., 2012). A resposta imune do hospedeiro está relacionada diretamente aos epítomos localizados no RBD. Mudanças nessa região do genoma podem alterar a interação do vírus com o receptor celular do hospedeiro, logo, é um fator decisivo para o reconhecimento de novos hospedeiros e a ocorrência de infecções cruzadas. Próximo às sequências que codificam o RBD, há uma região polimórfica ou Região Hiper-Variável (HVR), que tende a acumular alterações de nucleotídeos (nt) e aa. Determinadas alterações podem ter consequências na antigenicidade e patogenicidade do vírus

(BALLESTEROS, SANCHEZ e ENJUANES, 1997; HASOKSUZ et al., 2002; REKIK e DEA, 1994). Com relação à imunização, devido à alta taxa de mutação nessa região do genoma, as vacinas comerciais devem conter antígenos vacinais tão semelhantes antigenicamente e geneticamente quanto possível aos vírus de campo circulantes para fornecer uma imunidade eficaz (FULTON et al., 2013).

Como a maioria dos vírus RNA, o BCoV pode mutar em uma alta frequência devido à falta do mecanismo de correção em sua RNA polimerase. Baseado numa estimativa de um erro por 10.000 bases, a RNA polimerase do BCoV pode gerar aproximadamente três mutações aleatórias a cada 30 kb de genoma produzido em uma célula infectada (MALPICA et al., 2002). Esse fato deveria ser avaliado quando amostras clínicas são adaptadas e isoladas em cultivo celular antes do procedimento de sequenciamento. A propagação do BCoV em cultivo celular pode também afetar a composição antigênica, atividade hemaglutinante e replicação intestinal do vírus (HUSSAIN, STORZ e KOUSOULAS, 1991; KAPIL, TRENT e GOYAL, 1990; STORZ, ZHANG e ROTT, 1992). Mudanças fundamentais na composição de aa da proteína S foram descritas na cepa JHM de coronavírus murino – hepatite viral dos camundongos (MHV) após extensa propagação em cultura de tecidos (GALLAGHER e BUCHMEIER, 2001). Logo, é muito importante considerar tais eventos ao interpretar dados durante a análise molecular. No entanto, existem poucos estudos comparativos relacionados às mutações na proteína S em isolados de BCoV em linhagens celulares e o sequenciamento direto de amostras clínicas não são comumente realizadas (TAKIUCHI et al., 2008). O presente estudo reporta a detecção e o isolamento de um BCoV associado à doença respiratória e estabelece as relações filogenéticas a partir de sequências parciais do gene S. Além disso, compara molecularmente as sequências de BCoV obtidas diretamente da amostra clínica (secreção nasal) e do isolado adaptado ao longo das passagens celulares.

4.2 MATERIAL E METODOS

Rebanho e animais: O estudo foi realizado em um rebanho bovino de aptidão leiteira, localizado na cidade de Ouro Verde do Oeste, mesorregião Oeste do estado do Paraná (coordenadas geográficas 24°48'18"S e 53 54'10"W). O rebanho constituído por animais das raças Holandesa, Jersey e seus cruzamentos, possuía histórico de mortalidade de animais adultos e jovens em decorrência de doenças entéricas e

respiratórias. Na ocasião da coleta das amostras biológicas, realizada em agosto de 2016, os animais jovens (até 5 meses de idade) apresentavam-se dispneicos, com intensa secreção nasal serosa e estertor pulmonar e ausência de diarreia. O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, sob o Protocolo nº 34/2016.

Coleta de amostras biológicas e processamento inicial: Foram coletadas amostras de secreção nasal de 11 bezerras, diretamente das narinas, por meio da fricção de suabe nasal estéril (um para cada narina) e acondicionados em tubos de fundo cônico contendo 2 mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 15 mM KH₂PO₄). Após agitação mecânica por 15 segundos, os suabes foram descartados e da suspensão resultante foram separadas alíquotas de 450 µL para extração do ácido nucleico. Amostras fecais dos respectivos animais também foram coletadas diretamente da ampola retal e acondicionadas em frascos coletores universais. As fezes foram diluídas em tampão pH 7,4 (Tris-HCl 0,089 mM/L, CaCl₂ 0,15 mM/L, com concentração final de 10 a 20% (peso/volume), homogeneizadas por agitação mecânica vigorosa, centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos, tendo o sobrenadante recolhido e submetido à extração do ácido nucleico viral.

Extração de ácido nucléico viral: Para a extração do ácido nucléico viral foi utilizada a associação das técnicas fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/isotiocianato de guanidina, com adaptações (ALFIERI et al., 2006). As suspensões das amostras biológicas foram tratadas com sódio dodecil sulfato (SDS) 1% e mantidas em banho-maria a 56°C por 30 min. Igual volume da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico foi adicionado, seguidos por agitação mecânica, incubação em banho-maria a 56°C por 15 min e centrifugação a 10.000 rpm por 10 min (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). O sobrenadante obtido foi submetido ao protocolo de extração com sílica e isotiocianato de guanidina, conforme descrito por Boom et al. (1990) com adaptações. Os ácidos nucleicos extraídos foram eluídos da matriz de sílica em 50 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) autoclavada e mantidos a -20°C até o momento do uso. Para a certificação e validação dos procedimentos de extração realizados, foram incluídas alíquotas de água DEPC como controle negativo e a cepa protótipo BCoV-*Kakegawa* propagada em células HRT-18, como controle positivo.

Detecção do BCoV por Semi-Nested RT-PCR (gene N): As amostras foram submetidas à *Semi-Nested*-RT-PCR para amplificação parcial do gene N, que é altamente conservado entre os BCoV. Na primeira etapa de amplificação foram utilizados os *primers* BCoV-1 *sense*: 5'-CGA TGA GGC TAT TCC GAC-3' (nt 504-521) e BCoV-2 *antisense*: 5'-TGT GGG TGC GAG TTC TGC-3' (nt 940-957) que flanqueiam um fragmento de 454 pb. A segunda etapa de amplificação foi realizada com a utilização de um *primer* interno BCoV-3 *sense*: 5'-TTG CTA GTC TTG TTC TGG C-3' (nt 707-725) e o BCoV-2 *antisense* que flanqueiam o fragmento de 251 pb. As posições dos *primers* foram calculadas em relação à cepa protótipo Mebus do BCoV (código de acesso do Genbank U00735). As condições da *Semi-Nested* RT-PCR foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Takiuchi et al. (2006). As amostras triadas como positivas nesta etapa foram submetidas à RT-PCR para amplificação parcial do gene da glicoproteína S e à tentativa de isolamento viral em cultura de células HRT-18.

RT-PCR para amplificação parcial do gene S do BCoV: Para proceder o estudo de variabilidade genética do BCoV, as amostras previamente triadas como positivas na *Semi-Nested* RT-PCR (gene N) foram submetidas à RT-PCR para amplificação parcial do gene da glicoproteína S. Foram utilizados três pares de *primers* que flanqueiam uma região de 1447 nt, incluindo a região HVR e o sítio de clivagem proteolítica da S (TAKIUCHI, ALFIERI e ALFIERI, 2008). A sequência e posição dos *primers* e o tamanho dos fragmentos amplificados estão especificados na TABELA 1. Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), 5 µL do RNA extraído, 1 µL do *primer reverse* à concentração de 20 pmol (*Invitrogen Life Technologies*) e 4 µL de água ultrapura autoclavada foram incubados a 97°C por 6 min. Após esse período, as amostras foram imediatamente imersas em banho de gelo por 5 min, seguido da adição de 10 µL de uma solução denominada RT-MIX contendo 1 x RT buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM de dietiltreitol), 0,1 mM de cada dNTP (*EasyGen®*), 100 unidades da enzima M-MLV *Reverse transcriptase* (Promega) e água ultrapura autoclavada para a obtenção de um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada a 42°C por 30 min seguida de etapa para inativação da enzima a 95° C por 5 min. A PCR foi realizada com a adição de 8 µL de cDNA em 42 µL de uma solução PCR-MIX contendo 1,5 x PCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCL), 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µL do *primer reverse* e 1 µL do *primer forward* a 20 pmol; 2,5 unidades da enzima *Platinum Taq DNA polimerase*

(Invitrogen Life Technologies) e água ultrapura autoclavada qsp. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Amplitherm thermal cyclers*) com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa a 94° C por 4 min, seguida de 40 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 1 min a 52°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). A etapa de extensão final ocorreu a 72°C por 7 minutos.

TABELA 1 - Pares de primers utilizados para amplificação parcial do gene S do BCoV.

Pares de primers	Sequência	Posição*	Polaridade	Tamanho do produto
SPK5_FOR SPK5_REV	GAA TTG ATA CTA CTG CTA C TCA TAA TTA ACA CAA ACA CC	1256-1274 1885-1904	Positivo Negativo	648 pb
SPK6_FOR SPK6_REV	GTA ATC CTT GTA CTT GCC TAG TAA ACC GAT AAC CAG T	1721-1738 2314-2332	Positivo Negativo	612 pb
SPK7_FOR SPK7_REV	TAA CTC TTC CGA ACC AGC A AAT CGC TTC CTA AAC AAC C	2085-2103 2701-2719	Positivo Negativo	636 pb

*Em relação ao gene S da cepa protótipo Mebus do BCoV.

Fonte: TAKIUCHI, ALFIERI e ALFIERI (2008).

Análise dos produtos da *Semi-Nested* PCR e RT-PCR: Alíquotas de 4 µL dos produtos da *Semi-Nested* PCR e RT-PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (100V) durante aproximadamente 60 minutos. O gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL para posterior visualização dos amplicons em transiluminador UV e fotodocumentação digital (Fotodocumentador *L-Pix Touch – Loccus*).

Purificação e Sequenciamento: Os produtos amplificados foram purificados com o kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen, 17 Carlsbad, CA, USA), quantificados com fluorômetro Qubit™ (Invitrogen Life Technologies, USA) e sequenciados com *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®) no analisador genético automático modelo ABI 3500 (Applied Biosystems®), utilizando os *primers forward* e *reverse* para seus respectivos alvos de interesse (gene N ou S).

Análise filogenética: A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelo programa Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e então, utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foi possível comparar a identidade dos produtos obtidos, com sequências depositadas em bases públicas de dados (*GenBank*). As sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com sequências de

cepas protótipos de BCoV e de diferentes isolados através do programa ClustalW. Os alinhamentos foram editados e corrigidos manualmente no programa BioEdit versão 7.2.6.1. Para avaliação filogenética foram incluídas sequências parciais do gene S, incluindo a região HVR do BCoV. As árvores filogenéticas foram construídas com o programa MEGA versão 7.0, utilizando o método *Maximum Likelihood* a partir de distâncias estimadas pelo modelo *Tamura-Nei* (KUMAR, STECHER e TAMURA, 2016; TAMURA e NEI, 1993). A análise filogenética foi realizada através do método de *bootstrapping* (com base em 1.000 réplicas). A predição dos potenciais sítios de N-glicosilação da porção estudada da proteína S foi realizada utilizando o servidor *CBS NetNGlyc* 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

Inoculação viral em células HRT-18: Células de tumor retal humano (HRT-18) foram cultivadas em meio *Eagle Dulbecco* modificado (DMEM, Gibco BRL®, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, Gibco BRL®, EUA), 55 µg/mL de gentamicina (Sigma Co., EUA) e 2,5 µg/mL de anfotericina B (*Bristol-Meyers Squibb* Co., Brasil). As monocamadas confluentes foram lavadas com PBS livre de cálcio e de magnésio. Previamente à inoculação, as suspensões das amostras biológicas selecionadas para tentativa de isolamento viral foram tratadas com gentamicina (100 mg/mL) e anfotericina B (10 mg/mL). As células inoculadas foram mantidas a 37°C para observação de efeito citopático (ECP) juntamente com células HRT-18 não inoculadas (controle negativo) e inoculadas com a cepa BCoV protótipo *Kakegawa* (controle positivo). Com o objetivo de avaliar as mutações induzidas pela replicação do BCoV *in vitro*, o procedimento foi repetido até que se completassem nove passagens celulares. Alíquotas de 50 µL do sobrenadante de células inoculadas de cada passagem foram separadas e acrescidas de 400 µL de PBS para proceder a extração do ácido nucleico viral e subsequente *Semi-Nested* PCR (gene N) e RT-PCR (gene S).

4.3 RESULTADOS

O BCoV foi detectado nas secreções nasais, pela *Semi-Nested* RT-PCR, de todos os animais amostrados (n=11), entre os quais oito já resultaram positivos na primeira etapa de amplificação parcial do gene N (produto de 454 pb) (Apêndice A). As outras três amostras de secreção nasal e seis amostras fecais revelaram-se

positivas somente após a segunda etapa de amplificação genômica, gerando produto com o tamanho esperado de 251 pb.

Das amostras (secreção nasal e fezes) BCoV positivas para o gene N, foram selecionadas aquelas que geraram banda única e de boa intensidade para o sequenciamento genômico. Na análise preliminar das sequências obtidas e confrontadas com outras sequências depositadas em bancos de dados públicos, foi confirmada a identidade de todos os produtos amplificados como BCoV, em referência ao gene N. Entretanto, apenas as sequências ($n=10$) obtidas das secreções nasais apresentaram qualidade satisfatória para proceder a caracterização molecular, que revelaram-se 100% idênticas entre si nos fragmentos analisados.

Das 10 amostras de secreção nasal triadas como positivas para o gene N, três foram selecionadas para amplificação do gene S, denominadas BOV13-NS, BOV19-NS e BOV21-NS. A amplificação satisfatória dos três fragmentos contíguos do gene S foi obtida apenas com a amostra BOV19-NS, sendo esta, portanto, selecionada para a tentativa de isolamento viral em cultivo celular. O sequenciamento da referida amostra resultou numa sequência consenso de 1447 nt (nt 1258 a 2705 em relação a cepa Mebus) que foi utilizada para proceder a análise filogenética. As amostras BOV13 e BOV21 amplificaram a região flanqueada pelos *primers* SPK6-FOR e SPK7-REV (998 nt) e SPK7-FOR e SPK7-REV (636 nt), respectivamente. O alinhamento das sequências consenso obtidas das três amostras de secreção nasal demonstrou 100% de identidade entre si. Desta forma, todas as análises de caracterização molecular e filogenia foram realizadas baseando-se na amostra BOV19-NS.

Matriz de identidade e análise filogenética:

Em relação ao gene que codifica a proteína S do BCoV, a matriz de identidade e análise filogenética foram realizadas em duas etapas. A primeira etapa consistiu na análise do fragmento de 1447 nt, correspondendo à segunda metade do gene S1, além de incluir o sítio clivagem da proteína S. A matriz de identidade demonstrou maior similaridade da amostra BOV19-NS com os isolados brasileiros de BECoV denominados BRUEL-1, BRUEL-2 e BRUEL-3 (DQ479421.1; DQ479422.1 e DQ479423.1), alcançando 98,8% de identidade de nucleotídeos. A menor identidade de nt foi observada com o isolado de BECoV da França, amostra F15 (D00731.1), com 97,1%. A matriz de identidade de nt dos isolados de BCoV analisados está demonstrada no Apêndice B. Na árvore filogenética dois grandes clados foram

formados, separando as cepas protótipos de BECoV e cepas vacinais (clado 1) dos isolados de campo de BECoV, BRCov e WD de diversas localidades do mundo (clado 2) (FIGURA 1). No clado 2 foi evidenciada a formação de quatro grupos, identificados como A, B, C e D. A BOV19-NS agrupou-se no subclado 2C, que foi constituído exclusivamente por isolados brasileiros, incluindo os três isolados de BECoV (BR-UEL1 a 3). Nos subclados A e D agruparam-se exclusivamente os isolados de BCoV coreanos e europeus, respectivamente, enquanto o subclado B foi representado por isolados brasileiros de BECoV, e isolados cubanos e americanos de BECoV e BRCov.

A segunda etapa da análise filogenética foi efetuada a partir um fragmento de 438 nt, englobando a região polimórfica (HVR) da subunidade S1 do BCoV. O objetivo desta análise foi estabelecer as relações filogenéticas com outros isolados de BCoV brasileiros e do mundo que não puderam ser incluídos na análise anterior, em decorrência do tamanho da sequência de nt disponíveis nas bases públicas de dados. Nesta análise, a amostra BOV19-NS apresentou maior identidade de nt (98,4%) com um isolado brasileiro de BECoV, amostra PD1 (KT381471.1). A menor identidade foi observada com outro isolado de BECoV brasileiro, amostra USP-02 (AY606192.1), com 90,2% de identidade de nt entre eles. A matriz de identidade de nt dos isolados de BCoV incluídos nesta análise está demonstrada no Apêndice C. Na árvore filogenética também foram revelados dois grandes clados (1 e 2). O clado 1, além de agrupar as cepas BCoV protótipos e vacinais, também incluiu as amostras brasileiras USP-02, USP-03 e USP-04 (AY606192.1, AY606193.1 e AY606194.1). No entanto, o clado 2 apresentou três subclados (A, B e C), ao invés dos quatro anteriormente descritos. O subclado 2A foi formado apenas por isolados brasileiros de BECoV e BRCov, incluindo a amostra do presente estudo BOV19-NS. O subclado 2B agrupou os isolados americanos, asiáticos e cubanos, enquanto o 2C foi constituído apenas por isolados europeus (FIGURA 2).

FIGURA 1 - Análise filogenética baseada na sequência parcial de 1447 nt (nt 1258 a 2705 em relação a cepa Mebus) do gene S de isolados de BCoV. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo evolutivo *Tamura-Nei*, com distribuição *Gamma* 5, sítios Invariantes (ML + TN93 + G + I) e 1.000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* acima de 70 são indicados próximos aos nós. Os isolados incluídos na análise estão identificados com o número de acesso *GenBank*/nome da cepa/país de origem/ano de isolamento. Os isolados respiratórios estão indicados pelo símbolo ▲ e os isolados entéricos, pelo símbolo ○. A sequência obtida neste estudo está indicada pelo símbolo ▲.

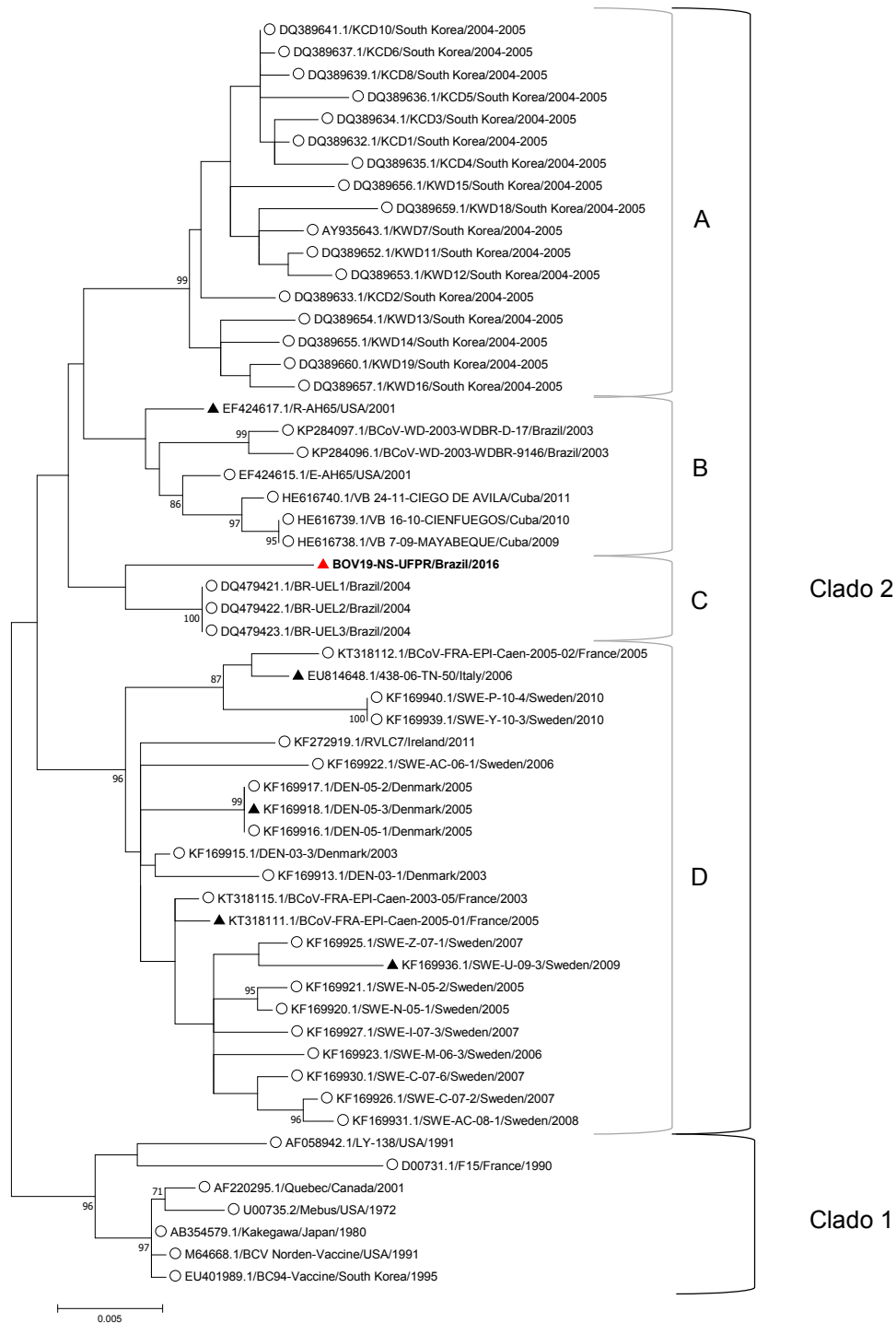
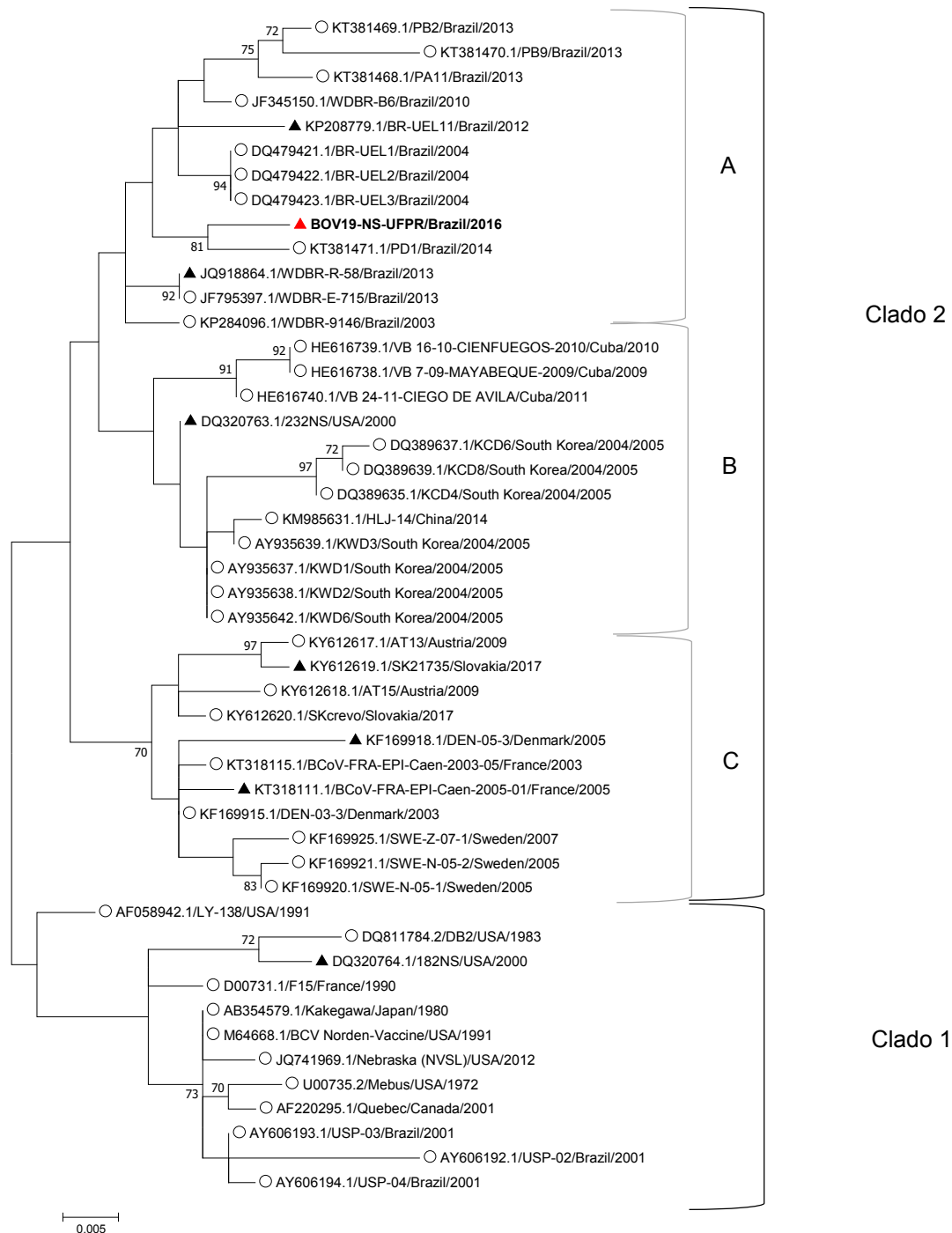


FIGURA 2 - Análise filogenética baseada em 438 nt da região polimórfica HVR do gene S (nt 1339 – 1777 em relação a cepa Mebus) de diferentes isolados de BCoV. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo evolutivo *Tamura-Nei*, com distribuição *Gamma 5* (ML + TN93 + G) e 1.000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* acima de 70 são indicados próximos aos nós. Os isolados incluídos na análise estão identificados com o número de acesso *GenBank*/nome da cepa/país de origem/ano de isolamento. Os isolados respiratórios estão indicados pelo símbolo ▲ e os isolados entéricos, pelo símbolo ○. A sequência obtida neste estudo está indicada pelo símbolo ▲.



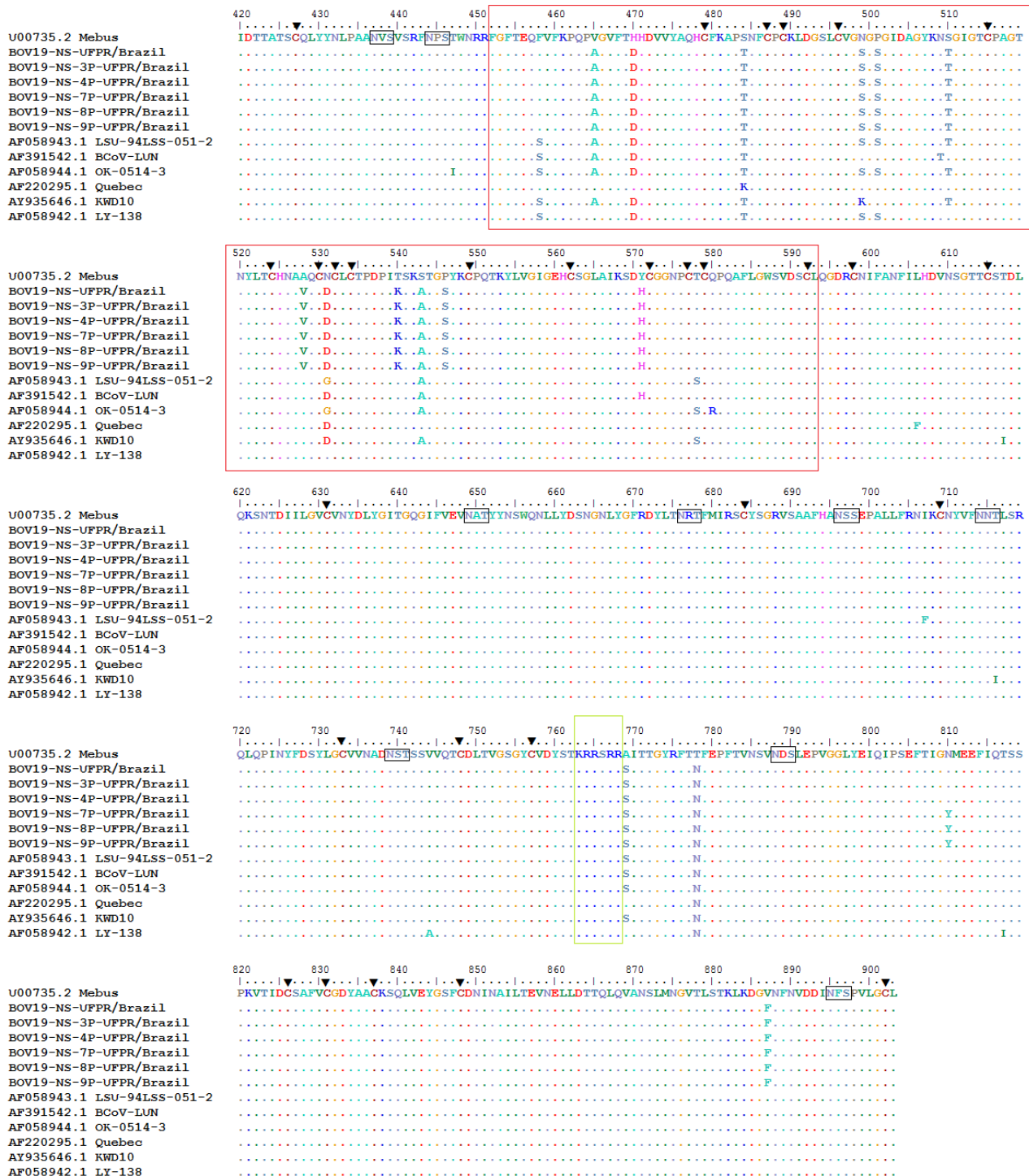
Isolamento do BCoV em cultivo celular:

Após quatro passagens em linhagem celular HRT-18, a amostra BOV19-NS foi isolada com sucesso, sendo observado ECP característico da segunda a nona passagem, com células granulares, arredondadas e inchadas. Nenhum ECP foi observado no controle negativo. O isolamento do BCoV foi confirmado com a amplificação parcial do gene N a partir do sobrenadante obtido das células inoculadas de todas as passagens celulares (1ª a 9ª passagem). Exceto para o sobrenadante oriundo da 1ª passagem, o gene N foi satisfatoriamente amplificado com apenas uma etapa de amplificação (454 bp). Para o gene S, o sequenciamento dos três segmentos genômicos contíguos (1447 nt) foi obtido com sucesso dos isolados da amostra BOV19-NS nas 3ª, 4ª, 7ª, 8ª e 9ª passagens. O isolamento do BCoV a partir das amostras fecais reveladas positivas na *Semi-Nested* RT-PCR (gene N) não foi obtido, mesmo após quatro passagens consecutivas.

Caracterização molecular da amostra BOV19-NS antes e após passagem em cultivo celular:

Ao comparar o fragmento 1451 nt (nt 1258 a 2709 em relação a cepa protótipo Mebus) da amostra BOV19-NS antes e após suas respectivas passagens em cultivo celular (3, 4ª, 7ª, 8ª e 9ª passagens), foi identificada apenas uma substituição nucleotídica na posição de nt 2428 (AAT→TAT) a partir da 7ª passagem, que resultou na mutação não sinônima de transversão, carga neutra-neutra, Asn⁸¹⁰→Tyr (FIGURA 3). Comparando o isolado obtido neste estudo com o protótipo ancestral de BCoV, cepa Mebus, foram identificadas 33 substituições nucleotídicas, das quais 15 resultaram em mutações não sinônimas (9 transições e 6 transversões). Os resíduos de aa e as mutações observadas estão indicadas na FIGURA 3. Não foram detectadas inserções ou deleções.

FIGURA 3 - Alinhamento das sequências deduzidas de aminoácidos (aa 420-903 em relação à cepa protótipo Mebus) do gene S obtidas do sequenciamento direto da amostra BOV19-NS-UFPR/Brazil e após a 3, 4^a, 7^a, 8^a e 9^a passagens (3P, 4P, 7P, 8P e 9P) e cepas protótipos de BCoV. Os pontos (.) indicam aa idênticos; o quadro vermelho indica a região HVR (aa 452 a 593); o quadro verde indica o sítio de clivagem proteolítica (aa 763 a 768); as molduras pretas indicam os potenciais sítios de glicosilação; as flechas pretas indicam os resíduos de cisteína.



Das 15 alterações de aminoácidos, três perderam a característica de hidrofobicidade (Pro⁵⁰¹→Ser, Pro⁵⁴⁶→Ser e Ala⁷⁶⁹→Ser), e uma adquiriu tal característica (Ser⁵⁴³→Ala). Além disso, quatro aminoácidos polares (hidrofílicos) alteraram sua carga: positiva para negativa (His⁴⁷⁰→Asp), neutra para negativa (Asn⁵³¹→Asp) e neutra para positiva (Thr⁵⁴⁰→Lys e Tyr⁵⁷¹→His). Dos 29 resíduos de cisteína detectados na porção estudada, 15 se concentraram na região polimórfica HVR, revelando-se conservados quando comparados a outras cepas protótipos. (FIGURA 3).

4.4 DISCUSSÃO

A utilização da *Semi-Nested* RT-PCR com alvo para o gene N foi satisfatória para o diagnóstico do BCoV em animais acometidos por doença respiratória. O BCoV foi detectado na secreção nasal de todos os animais avaliados (n=11). A escolha da região alvo para amplificação genômica é muito importante para a otimização do diagnóstico de BCoV. O gene que codifica a proteína N é altamente conservado entre os isolados de BCoV e também é o mais abundante nas células infectadas na forma de RNAsg, fatores que elevam a sensibilidade da técnica (HISCOX, CAVANAGH e BRITTON, 1995; TAKIUCHI et al., 2006).

Ao avaliar as amostras respiratórias, oito animais revelaram-se BCoV positivos na primeira etapa de amplificação do gene N. Embora os animais amostrados não apresentassem diarreia no momento da coleta, o BCoV foi detectado nas fezes de seis animais. Destas, somente uma amostra fecal foi positiva na primeira etapa de amplificação. Casos de co-deteção de BCoV em amostras nasais e fecais já foram relatados por outros autores. Uma possível explicação é que os animais se infectem primariamente pela via oronasal e após replicação viral no trato respiratório, os virions são deglutidos e migram para o trato gastrointestinal (HASOKSUZ et al., 2002; MARTÍNEZ et al., 2012; THOMAS et al., 2006). Em um estudo experimental, bezerros privados de colostro e gnotobióticos foram inoculados com isolados de BRCov e, posteriormente, apresentaram-se diarreicos com a eliminação do vírus pelas fezes (CHO et al., 2000).

A inoculação da amostra entérica em células HRT-18 não resultou em isolamento e visualização de ECP, mesmo após quatro passagens, verificados por RT-PCR e SN-PCR (gene S e gene N, respectivamente). Durante o estudo, algumas

dificuldades no isolamento da amostra fecal foram constatadas. No momento da coleta, sugere-se que a baixa carga viral viável, somada ao baixo número de passagens, podem ter resultado na falha do isolamento da amostra entérica.

A análise filogenética baseada no fragmento de 1447 nt do gene S mostrou a formação de clados e subclados com diferentes isolados de BCoV, demonstrando uma tendência de separação filogeográfica. A amostra respiratória do presente estudo foi agrupada com cepas entéricas brasileiras (BR-UEL 1, 2 e 3), coletadas em 2004 no estado de Minas Gerais. Os outros isolados brasileiros entéricos associados a surtos de WD ocorridos em 2003 (WDBR-9146 e WDBR-D-17), encontraram-se no mesmo subclado que as cepas cubanas (WD) e norte-americanas (BECov e BRCov), como já verificado por Souza (2013). Martinez et al. (2012) sugeriram uma origem comum das amostras cubanas e americanas. Alekseev et al. (2008) verificaram que cepas de CoV de ruminantes selvagens se agrupavam com cepas de BCoV de acordo com o ano de isolamento e circulação. A primeira evidência de infecção por BCoV em Cuba foi em 2004 (BARRERA VALLE et al., 2006). Logo, uma possível justificativa seria uma origem comum (norte-americana) das cepas deste subclado, circulantes entre 2001 e 2004. No entanto, permanece incerto como ocorreu a transmissão do vírus (MARTÍNEZ et al., 2012; SOUZA, 2013).

A análise filogenética da região HVR (438 nt) do gene S, resultou em um padrão filogeográfico diferente da análise do fragmento maior. Três subclados foram gerados, sendo que a maioria das amostras brasileiras foram agrupadas no mesmo subclado (2A). No entanto, as diferentes porcentagens de identidade entre essas amostras indicam que mais de uma cepa pode estar circulando no país. A amostra BOV19-NS agrupou-se no mesmo ramo filogenético que uma amostra entérica identificada como PD1, coletada em maio de 2014, na cidade de Itaocara, Rio de Janeiro. Outras amostras desse estudo foram incluídas na árvore, no entanto estas foram coletadas em outras cidades do RJ e em períodos diferentes (PB2 e PB9 - Itaboraí/RJ – dezembro/2013; PA11 – Sampaio Correa/RJ – outubro/2013) (ROCHA et al., 2018). Acredita-se que o comércio e a intensa movimentação do gado entre diferentes regiões de um país favoreçam a difusão de diferentes cepas e o surgimento de novas variantes genéticas de BCoV. O restante das amostras brasileiras entéricas identificadas como USP-02, 03 e 04 contém um *gap* de 18 nt (deleção de 6 aa) nas posições 1577 a 1594 na região HVR do gene S, o que levou a agruparem-se no clado

1 juntamente com as cepas protótipos (BEUTTEMMULLER et al., 2017; BRANDAO et al., 2006).

Em ambas as árvores filogenéticas, foi evidenciada a separação das cepas pela origem geográfica ou período de coleta, ao invés da separação por origem (entérica ou respiratória) da amostra. Logo, não existem mutações características suficientes nas porções estudadas que diferenciem isolados entéricos de respiratórios (SINGASA et al., 2017; VILCEK et al., 2017).

A distinção entre isolados entéricos e respiratórios permanece um desafio, com conclusões contraditórias na literatura científica atual (VILCEK et al., 2017). Enquanto alguns estudos tem demonstrado que algumas cepas de BRCoV apresentam características genéticas, patogênicas e antigênicas semelhantes quando comparadas às cepas de BECoV (HASOKSUZ et al., 1999b; REYNOLDS et al., 1985; TSUNEMITSU et al., 1991; ZHANG et al., 1994), outros autores indicaram que variações em tais aspectos ocorrem (CHOULJENKO et al., 1998; CHOULJENKO et al., 2001; HASOKSUZ et al., 1999a; LIN et al., 2000; LIN, O'REILLY e STORZ, 2002; ZHANG et al., 2007).

As cepas protótipos, apesar de pertencerem a diferentes regiões geográficas, foram isoladas há muitos anos e agruparam-se em um clado específico. Possivelmente há uma deriva genética aleatória (variação alélica) e uma divergência de um tropismo entérico para um duplo tropismo (entérico e respiratório) ocorrendo ao longo do tempo nas cepas atualmente circulantes (HASOKSUZ et al., 2002; KANNO et al., 2007; PARK et al., 2006). Essa divergência pode trazer consequências na imunidade humoral dos bovinos, em decorrência da aplicação de vacinas comerciais para BCoV atualmente disponíveis no mercado. No Brasil e em diversos outros países, as medidas de controle para BRCoV são limitadas. A maioria das vacinas disponíveis são licenciadas para o controle da doença entérica neonatal, com cepas protótipos utilizadas como antígenos, como a cepa entérica Mebus. Logo, a eficácia da vacina frente a novas cepas circulantes é questionável, principalmente na cobertura de doenças respiratórias envolvendo o BCoV (FULTON et al., 2013; SAIF, 2010; BEUTTEMMULLER et al., 2017).

Ao analisar a amostra respiratória BOV19-NS e suas respectivas passagens após isolamento em cultivo celular, nenhuma alteração foi observada entre elas, exceto uma mutação não sinônima no resíduo 810, detectada a partir da 7ª passagem. Acredita-se que cepas entéricas sejam mais propensas a alterações durante as

adaptações em cultivos celulares e passagens, do que cepas respiratórias de BCoV. Em estudo conduzido por Zhang et al. (2007) com o genoma completo, um isolado entérico apresentou 104 mutações em nt, enquanto que o isolado respiratório do mesmo animal apresentou apenas 8 alterações, após 15 e 14 passagens em cultivo celular, respectivamente. Assim, é possível que certas cepas de BCoV exijam mais passagens cumulativas para a manifestação de mutações genéticas significativas, mudanças de tropismo ou mudanças na virulência.

Nas amostras analisadas foram observadas diversas alterações nas cargas dos aa abrangendo a região HVR e RBD do gene S, que contêm importantes epítomos neutralizantes responsáveis pela interação com os receptores da célula hospedeira. Substituições de um aa hidrofóbico por um polar/carregado ou vice-versa, além de substituições da carga em aa polares, podem alterar a conformação da proteína e consequentemente sua função. Logo, impactos nos epítomos de neutralização, no escape imunológico e antigenicidade do vírus com o hospedeiro são esperados (SCHAEFER e ROST, 2012; YOO e DEREGT, 2001). Além disso, estudos relacionados com MHV, o membro da família *Coronaviridae* mais estudado e pertencente também ao gênero *Betacoronavirus*, demonstraram que mutações específicas na região HVR reduziram a neurovirulência de cepas altamente neuropatogênicas (GALLAGHER, PARKER e BUCHMEIER, 1990; WANG, FLEMING e LAI, 1992).

As alterações de aa detectadas (FIGURA 3) foram condizentes com outros relatos, sobretudo nas regiões em que a polaridade foi substituída. As mutações de Pro⁵⁰¹→Ser e Pro⁵⁴⁶→Ser, ambas na região antigênica e com consequente perda da hidrofobicidade, podem desencadear mudanças na antigenicidade, ou até mesmo na virulência entre cepas (ZHANG, KOUSOULAS e STORZ, 1991). Yoo and Dereg (2002) reportaram que apenas uma alteração de aa no resíduo 528 (Ala⁵²⁸→Val) na subunidade S1 do gene S, em mutante gerado por pressão de seleção *in vitro*, conferiu-lhe resistência à neutralização por anticorpos monoclonais. Conforme demonstrado na FIGURA 3, nosso isolado apresentou a mesma mutação, configurando a primeira descrição no mundo obtida de um isolado de BCoV selvagem.

Alguns autores consideram que determinadas alterações específicas nos resíduos 510 (Ser⁵¹⁰→Thr), 531 (Asn⁵³¹→Asp) e 578 (Thr⁵⁷⁸→Ser) possam ser marcadores de cepas respiratórias (CHOULJENKO et al., 1998; GELINAS et al., 2001; YOO e DEREGT, 2001; MARTINEZ et al., 2012). Com exceção do resíduo 578, nosso

isolado também apresentou as mutações caracterizadas como marcadores de BRCov nos resíduos 510 e 531. Hasoksuz et al. (2002) demonstraram que as alterações Ser⁵¹⁰→Thr e Asn⁵³¹→Asp levaram, respectivamente, à redução de hidrofiliidade e alteração para carga negativa, podendo afetar o dobramento da proteína e suas propriedades físico químicas. Outro fator que poderia ser característico de isolados respiratórios é a substituição para glicina no resíduo 531 e ácido aspártico ou asparagina para isolados entéricos (YOO e DEREKT, 2001). No entanto, contrariamente à especulação de Yoo e Deregk (2001), a BOV19-NS teve uma substituição por ácido aspártico no resíduo 531 ao invés de glicina. Considerando que outros estudos também observaram ácido aspártico em isolados respiratórios, como glicina em isolados entéricos, é improcedente que este resíduo constitua um marcador respiratório (HASOKSUZ et al., 2002; JEONG et al., 2005; KANNO et al., 2007). Recentemente, a caracterização molecular dos isolados cubanos provenientes de amostras fecais de vacas com sinais de WD, também demonstrou que as alterações nos resíduos 510, 531 e 578 não foram exclusivas de BRCov (MARTINEZ et al., 2012).

Em comparação com isolados brasileiros, nenhuma amostra analisada apresentou deleção no segmento analisado conforme os isolados de BCoV descritos por Brandão et al. (2006). Da mesma maneira, não foi observada mutação no sinal de clivagem como observada em outros isolados brasileiros (TAKIUCHI et al., 2007). O sítio de clivagem KRRSRR (764-768) se manteve conservado na amostra respiratória analisada e suas passagens, com apenas uma alteração imediatamente após o sítio de clivagem, Ala⁷⁶⁹→Ser. Chouljenko et al. (1998) propuseram que tal substituição seria específica para isolados respiratórios. Porém, tanto isolados respiratórios como entéricos de outros estudos apresentaram também o aa serina, concluindo que tal alteração não é um potencial marcador de tropismo respiratório (HASOKSUZ et al., 2002; JEONG et al., 2005; KANNO et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2012).

Dos 29 resíduos de cisteína detectados na porção estudada, 15 resíduos foram detectados na região HVR, semelhante à Yoo et al. (1991). Além disso, mantiveram-se conservados quando comparados às outras cepas. A alta concentração deste aminoácido na região HVR pode estar envolvida na formação de determinantes antigênicos pelas ligações dissulfeto (YOO e DEREKT, 2001). Esses resíduos conferem estabilidade na estrutura e função das proteínas mediante formação de ligações dissulfeto, mantendo a maturação e localização adequadas através de

interações intermoleculares proteína-proteína (MEITZLER et al., 2013; MORAND et al., 2004).

4.5 CONCLUSÃO

O presente estudo detectou e isolou um BRCoV na região oeste do Paraná proveniente de uma amostra de secreção nasal de um animal agudamente infectado. Este é o primeiro relato de isolamento de BCoV em cultivo celular associado à doença respiratória no Brasil. Além disso é pioneiro na caracterização molecular do isolado selvagem e do respectivo adaptado em cultivo após sucessivas passagens. Devido à escassez de estudos envolvendo a caracterização molecular e análise filogenética de isolados respiratórios no país, um estudo detalhado com um número maior de passagens e com a avaliação do genoma inteiro ou gene S inteiro do BCoV devem ser considerados. Se a divergência genética afetar epítomos neutralizantes e outros epítomos-chave, com o escape viral do sistema imunológico, as vacinas contendo cepas de campo de BCoV mais contemporâneas podem ser necessárias para aumentar a eficácia da proteção humoral dos bovinos.

4.6 REFERÊNCIAS - CAPÍTULO 1

- ALEKSEEV, K. P.; VLASOVA, A. N.; JUNG, K.; HASOKSUZ, M.; ZHANG, X.; HALPIN, R.; WANG, S.; GHEDIN, E.; SPIRO, D.; SAIF, L. J. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. **Journal of Virology**, v. 82, n. 24, p. 12422-12431, 2008.
- ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical animal health and production**, v. 38, n. 7-8, p. 521-526, 2006.
- BALLESTEROS, M. L.; SANCHEZ, C. M.; ENJUANES, L. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. **Virology**, v. 227, n. 2, p. 378-388, 1997.
- BARIC, R. S.; NELSON, G. W.; FLEMING, J. O.; DEANS, R. J.; KECK, J. G.; CASTEEL, N.; STOHLMAN, S. A. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. **Journal of Virology**, v. 62, n. 11, p. 4280-4287, 1988.
- BARRERA VALLE, M.; RODRÍGUEZ BATISTA, E.; BETANCOURT MARTELL, A.; FRÍAS LEPUROUX, M. T.; BRANDÃO, P. Short communication. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. **2006**, v. 4, n. 3, p. 4, 2006.
- BEUTTEMULLER, E. A.; ALFIERI, A. F.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. Brazilian strain of bovine respiratory coronavirus is derived from dual enteric and respiratory tropism. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 16, n. 2, 2017.
- BOILEAU, M. J.; KAPIL, S. Bovine coronavirus associated syndromes. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 1, p. 123-146, table of contents, 2010.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BRANDAO, P. E.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J.; ROSALES, C. A.; VILLARREAL, L. Y.; JEREZ, J. A. Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. **Archives of virology**, v. 151, n. 9, p. 1735-1748, 2006.
- CAVANAGH, D. The Coronavirus Surface Glycoprotein. In: S. G. Siddell (Ed.). **The Coronaviridae**. Boston, MA: Springer US, 1995. 73-113.

CHO, K. O.; HALBUR, P. G.; BRUNA, J. D.; SORDEN, S. D.; YOON, K. J.; JANKE, B. H.; CHANG, K. O.; SAIF, L. J. Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery-like disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 8, p. 1191-1194, 2000.

CHOULJENKO, V. N.; KOUSOULAS, K. G.; LIN, X.; STORZ, J. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. **Virus genes**, v. 17, n. 1, p. 33-42, 1998.

CHOULJENKO, V. N.; LIN, X. Q.; STORZ, J.; KOUSOULAS, K. G.; GORBALENYA, A. E. Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. **The Journal of general virology**, v. 82, n. Pt 12, p. 2927-2933, 2001.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J. Bovine coronaviruses from the respiratory tract: antigenic and genetic diversity. **Vaccine**, v. 31, n. 6, p. 886-892, 2013.

GALLAGHER, T. M.; PARKER, S. E.; BUCHMEIER, M. J. Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 64, n. 2, p. 731-741, 1990.

GALLAGHER, T. M.; BUCHMEIER, M. J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. **Virology**, v. 279, n. 2, p. 371-374, 2001.

GELINAS, A. M.; BOUTIN, M.; SASSEVILLE, A. M.; DEA, S. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. **Virus research**, v. 76, n. 1, p. 43-57, 2001.

HASOKSUZ, M.; LATHROP, S.; AL-DUBAIB, M. A.; LEWIS, P.; SAIF, L. J. Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 144, n. 12, p. 2441-2447, 1999a.

HASOKSUZ, M.; LATHROP, S. L.; GADFIELD, K. L.; SAIF, L. J. Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 10, p. 1227-1233, 1999b.

HASOKSUZ, M.; SREEVATSAN, S.; CHO, K. O.; HOET, A. E.; SAIF, L. J. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. **Virus research**, v. 84, n. 1-2, p. 101-109, 2002.

HISCOX, J. A.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Quantification of individual subgenomic mRNA species during replication of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. **Virus research**, v. 36, n. 2-3, p. 119-130, 1995.

HUSSAIN, K. A.; STORZ, J.; KOUSOULAS, K. G. Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike glycoprotein distinguish between vaccine and wild-type strains. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 442-445, 1991.

JEONG, J. H.; KIM, G. Y.; YOON, S. S.; PARK, S. J.; KIM, Y. J.; SUNG, C. M.; JANG, O. J.; SHIN, S. S.; KOH, H. B.; LEE, B. J.; LEE, C. Y.; KANG, M. I.; KIM, H. J.; PARK, N. Y.; CHO, K. O. Detection and isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. **The Journal of veterinary medical science**, v. 67, n. 2, p. 187-189, 2005.

KANNO, T.; HATAMA, S.; ISHIHARA, R.; UCHIDA, I. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. **The Journal of general virology**, v. 88, n. Pt 4, p. 1218-1224, 2007.

KAPIL, S.; TRENT, A. M.; GOYAL, S. M. Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. **Archives of virology**, v. 115, n. 1-2, p. 127-132, 1990.

KIN, N.; MISZCZAK, F.; DIANCOURT, L.; CARO, V.; MOUTOU, F.; VABRET, A.; AR GOUILH, M. Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 40, p. 186-191, 2016.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LI, F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. **Journal of Virology**, v. 89, n. 4, p. 1954-1964, 2015.

LIN, X. Q.; KL, O. E.; STORZ, J.; PURDY, C. W.; LOAN, R. W. Antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle during shipping fever pathogenesis. **Archives of virology**, v. 145, n. 11, p. 2335-2349, 2000.

LIN, X. Q.; O'REILLY, K. L.; STORZ, J. Antibody responses of cattle with respiratory coronavirus infections during pathogenesis of shipping fever pneumonia are lower with antigens of enteric strains than with those of a respiratory strain. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 1010-1013, 2002.

MALPICA, J. M.; FRAILE, A.; MORENO, I.; OBIES, C. I.; DRAKE, J. W.; GARCIA-ARENAL, F. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. **Genetics**, v. 162, n. 4, p. 1505-1511, 2002.

MARTÍNEZ, N.; BRANDÃO, P. E.; DE SOUZA, S. P.; BARRERA, M.; SANTANA, N.; DE ARCE, H. D.; PÉREZ, L. J. Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1870-1878, 2012.

MEITZLER, J. L.; HINDE, S.; BANFI, B.; NAUSEEF, W. M.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Conserved cysteine residues provide a protein-protein interaction surface in dual oxidase (DUOX) proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 10, p. 7147-7157, 2013.

MORAND, S.; AGNANDJI, D.; NOEL-HUDSON, M. S.; NICOLAS, V.; BUISSON, S.; MACON-LEMAITRE, L.; GNIDEHOU, S.; KANIEWSKI, J.; OHAYON, R.; VIRION, A.; DUPUY, C. Targeting of the dual oxidase 2 N-terminal region to the plasma membrane. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30244-30251, 2004.

NARAYANAN, K.; MAEDA, A.; MAEDA, J.; MAKINO, S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 8127-8134, 2000.

PARK, S. J.; JEONG, C.; YOON, S. S.; CHOY, H. E.; SAIF, L. J.; PARK, S. H.; KIM, Y. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; LEE, B. J.; CHO, H. S.; KIM, S. K.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3178-3188, 2006.

PARK, S. J.; KIM, G. Y.; CHOY, H. E.; HONG, Y. J.; SAIF, L. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; KIM, S. K.; SHIN, S. S.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. **Archives of virology**, v. 152, n. 10, p. 1885-1900, 2007.

REKIK, M. R.; DEA, S. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. **Archives of virology**, v. 135, n. 3-4, p. 319-331, 1994.

REYNOLDS, D. J.; DEBNEY, T. G.; HALL, G. A.; THOMAS, L. H.; PARSONS, K. R. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. **Archives of virology**, v. 85, n. 1-2, p. 71-83, 1985.

ROCHA, C.; FORNELLS, L. A.; ROJAS, M.; LIBETAL, M.; MANCHEGO, A.; PEZO, D.; SANTOS, N. Molecular epidemiology of coronavirus in faeces of Brazilian calves and Peruvian camelid herds. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.12, p.037-042, 2018.

SAIF, L. J. Bovine respiratory coronavirus. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 349-364, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In: M. A. Knobler S, Lemon S, et al. (Ed.). **The Cell: A Molecular Approach**. 1989.

SCHAEFER, C.; ROST, B. Predict impact of single amino acid change upon protein structure. **BMC genomics**, v. 13 Suppl 4, p. S4, 2012.

SINGASA, K.; SONGSERM, T.; LERTWATCHARASARAKUL, P.; ARUNVIPAS, P. Molecular and phylogenetic characterization of bovine coronavirus virus isolated from dairy cattle in Central Region, Thailand. v. 49, n. 7, p. 1523-1529, 2017.

SOUZA, S. P. **Um estudo sobre a diversidade molecular dos genes S e HE de Coronavírus bovino (BCoV)**. 82 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

STORZ, J.; ZHANG, X. M.; ROTT, R. Comparison of hemagglutinating, receptor-destroying, and acetylcholinesterase activities of avirulent and virulent bovine coronavirus strains. **Archives of Virology**, v. 125, n. 1, p. 193-204, 1992.

TAKIUCHI, E.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. **Journal of virological methods**, v. 131, n. 2, p. 148-154, 2006.

TAKIUCHI, E.; BARREIROS, M. A. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Identification of a mutation in the spike protein cleavage site in Brazilian strains of wild-type bovine coronavirus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 699-703, 2007.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 41, n. 4, p. 277-282, 2008.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular biology and evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

THOMAS, C. J.; HOET, A. E.; SREEVATSAN, S.; WITTUM, T. E.; BRIGGS, R. E.; DUFF, G. C.; SAIF, L. J. Transmission of bovine coronavirus and serologic responses in feedlot calves under field conditions. **American journal of veterinary research**, v. 67, n. 8, p. 1412-1420, 2006.

TSUNEMITSU, H.; YONEMICHI, H.; HIRAI, T.; KUDO, T.; ONOE, S.; MORI, K.; SHIMIZU, M. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. **The Journal of veterinary medical science**, v. 53, n. 3, p. 433-437, 1991.

VILCEK, S.; JACKOVA, A.; KOLESAROVA, M.; VLASAKOVA, M. Genetic variability of the S1 subunit of enteric and respiratory bovine coronavirus isolates. **Acta virologica**, v. 61, n. 2, p. 212-216, 2017.

WANG, F. I.; FLEMING, J. O.; LAI, M. M. Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity. **Virology**, v. 186, n. 2, p. 742-749, 1992.

YOO, D.; DEREGT, D. A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 2, p. 297-302, 2001.

YOO, D.; PARKER, M. D.; SONG, J.; COV, G. J.; DEREGT, D.; BABIUK, L. A. Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 91-98, 1991.

ZHANG, X.; HERBST, W.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Comparison of the S genes and the biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. **Archives of virology**, v. 134, n. 3-4, p. 421-426, 1994.

ZHANG, X.; HASOKSUZ, M.; SPIRO, D.; HALPIN, R.; WANG, S.; VLASOVA, A.; JANIES, D.; JONES, L. R.; GHEDIN, E.; SAIF, L. J. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. **Virology**, v. 363, n. 1, p. 1-10, 2007.

ZHANG, X. M.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 397-404, 1991.

5 CONCLUSÃO GERAL

1. O BCoV foi detectado em amostras de secreção nasal (n=11) e fecais (n=6) de animais com doença respiratória, utilizando a *Semi-Nested* RT-PCR para amplificação parcial do gene N;
2. O BCoV foi isolado em células HRT-18 a partir de uma amostra de secreção nasal (BOV19-NS). O isolamento do BCoV a partir das amostras fecais não foi obtido, mesmo após quatro passagens consecutivas;
3. As mutações identificadas na BOV19-NS não foram exclusivas de isolados respiratórios de BCoV e ao comparar o protótipo ancestral de BCoV, cepa Mebus, foram identificadas 15 mutações não sinônimas (9 transições e 6 transversões);
4. Foi detectada uma alteração de aa no resíduo 528 (Ala528→Val), localizada na região hipervariável da S1, que pode estar associada ao escape do sistema imunológico;
5. A análise filogenética baseada em sequências parciais do gene S, demonstrou uma tendência de separação filogeográfica dos isolados de BCoV e não pela origem (respiratória ou entérica) da amostra biológica.

6 REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, G.; ROEDER, P. L.; ZEWDU, R. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. **Tropical animal health and production**, v. 24, n. 2, p. 74-80, 1992.
- ALEKSEEV, K. P.; VLASOVA, A. N.; JUNG, K.; HASOKSUZ, M.; ZHANG, X.; HALPIN, R.; WANG, S.; GHEDIN, E.; SPIRO, D.; SAIF, L. J. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. **Journal of Virology**, v. 82, n. 24, p. 12422-12431, 2008.
- ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical animal health and production**, v. 38, n. 7-8, p. 521-526, 2006.
- ASANO, K. M.; DE SOUZA, S. P.; DE BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal of virological methods**, v. 169, n. 2, p. 375-379, 2010.
- BALLESTEROS, M. L.; SANCHEZ, C. M.; ENJUANES, L. Two amino acid changes at the N-terminus of transmissible gastroenteritis coronavirus spike protein result in the loss of enteric tropism. **Virology**, v. 227, n. 2, p. 378-388, 1997.
- BARIC, R. S.; FU, K.; CHEN, W.; YOUNT, B. High recombination and mutation rates in mouse hepatitis virus suggest that coronaviruses may be potentially important emerging viruses. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 380, p. 571-576, 1995.
- BARIC, R. S.; NELSON, G. W.; FLEMING, J. O.; DEANS, R. J.; KECK, J. G.; CASTEEL, N.; STOHLMAN, S. A. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: implications for viral transcription. **Journal of Virology**, v. 62, n. 11, p. 4280-4287, 1988.
- BARRERA VALLE, M.; RODRÍGUEZ BATISTA, E.; BETANCOURT MARTELL, A.; FRÍAS LEPUROUX, M. T.; BRANDÃO, P. Short communication. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. **2006**, v. 4, n. 3, p. 4, 2006.
- BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. A. Bovine coronavirus detection in a collection of diarrheic stool samples positive for group a bovine rotavirus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. SPE, p. 45-49, 2009.
- BELOUZARD, S.; MILLET, J. K.; LICITRA, B. N.; WHITTAKER, G. R. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011-1033, 2012.

- BENFIELD, D. A.; SAIF, L. J. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1454-1457, 1990.
- BEUTTEMULLER, E. A.; ALFIERI, A. F.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. Brazilian strain of bovine respiratory coronavirus is derived from dual enteric and respiratory tropism. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 16, n. 2, 2017.
- BEZERRA JR, P. S.; BRANDÃO, P. E.; PAVARINI, S. P.; VARASCHIN, M. S.; WOUTERS, F.; VILLARREAL, L. Y. B.; JEREZ, J. A.; COSTA, G. M. Surto de diarreia em vacas de um rebanho leiteiro na região sul de Minas Gerais: detecção de coronavírus bovino nas fezes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 992-995, 2009.
- BIDOKHTI, M. R. **Epidemiology and Molecular Tracing of Bovine Coronavirus and Bovine Respiratory Syncytial Virus Infections in Cattle Herds**. Tese (Doutorado) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Clinical Sciences, Uppsala, Suécia, 2013.
- BIDOKHTI, M. R.; TRAVEN, M.; OHLSON, A.; BAULE, C.; HAKHVERDYAN, M.; BELAK, S.; LIU, L.; ALENIUS, S. Tracing the transmission of bovine coronavirus infections in cattle herds based on S gene diversity. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 193, n. 2, p. 386-390, 2012.
- BOILEAU, M. J.; KAPIL, S. Bovine coronavirus associated syndromes. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 1, p. 123-146, table of contents, 2010.
- BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BORUCKI, M. K.; ALLEN, J. E.; CHEN-HARRIS, H.; ZEMLA, A.; VANIER, G.; MABERY, S.; TORRES, C.; HULLINGER, P.; SLEZAK, T. The role of viral population diversity in adaptation of bovine coronavirus to new host environments. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e52752, 2013.
- BRANDAO, P. E.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J.; ROSALES, C. A.; VILLARREAL, L. Y.; JEREZ, J. A. Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. **Archives of virology**, v. 151, n. 9, p. 1735-1748, 2006.
- BRANDÃO, P. E.; VILLARREAL, L. Y. B.; SOUZA, S. L. P. D.; RICHTZENHAIN, L. J.; JEREZ, J. A. Mixed infections by bovine coronavirus, rotavirus, and *Cryptosporidium parvum* in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 33-34, 2007.
- CAVANAGH, D. The Coronavirus Surface Glycoprotein. In: S. G. Siddell (Ed.). **The Coronaviridae**. Boston, MA: Springer US, 1995. 73-113.

CHO, K. O.; HALBUR, P. G.; BRUNA, J. D.; SORDEN, S. D.; YOON, K. J.; JANKE, B. H.; CHANG, K. O.; SAIF, L. J. Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery-like disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 8, p. 1191-1194, 2000.

CHO, K. O.; HASOKSUZ, M.; NIELSEN, P. R.; CHANG, K. O.; LATHROP, S.; SAIF, L. J. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. **Archives of virology**, v. 146, n. 12, p. 2401-2419, 2001a.

CHO, K. O.; HOET, A. E.; LOERCH, S. C.; WITTUM, T. E.; SAIF, L. J. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. **American journal of veterinary research**, v. 62, n. 9, p. 1436-1441, 2001b.

CHO, Y. I.; HAN, J. I.; WANG, C.; COOPER, V.; SCHWARTZ, K.; ENGELKEN, T.; YOON, K. J. Case-control study of microbiological etiology associated with calf diarrhea. **Veterinary microbiology**, v. 166, n. 3-4, p. 375-385, 2013.

CHOULJENKO, V. N.; KOUSOULAS, K. G.; LIN, X.; STORZ, J. Nucleotide and predicted amino acid sequences of all genes encoded by the 3' genomic portion (9.5 kb) of respiratory bovine coronaviruses and comparisons among respiratory and enteric coronaviruses. **Virus genes**, v. 17, n. 1, p. 33-42, 1998.

CHOULJENKO, V. N.; LIN, X. Q.; STORZ, J.; KOUSOULAS, K. G.; GORBALENYA, A. E. Comparison of genomic and predicted amino acid sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. **The Journal of general virology**, v. 82, n. Pt 12, p. 2927-2933, 2001.

CLARK, M. A. Bovine coronavirus. **The British veterinary journal**, v. 149, n. 1, p. 51-70, 1993.

COX, G. J.; PARKER, M. D.; BABIUK, L. A. Bovine coronavirus nonstructural protein ns2 is a phosphoprotein. **Virology**, v. 185, n. 1, p. 509-512, 1991.

CROUCH, C. F.; OHMANN, H. B.; WATTS, T. C.; BABIUK, L. A. Chronic Shedding of Bovine Enteric Coronavirus Antigen-Antibody Complexes by Clinically Normal Cows. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 7, p. 1489-1500, 1985.

DA SILVA, M. R.; O'REILLY, K. L.; LIN, X.; STINE, L.; STORZ, J. Sensitivity comparison for detection of respiratory bovine coronaviruses in nasal samples from feedlot cattle by ELISA and isolation with the G clone of HRT-18 cells. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 11, n. 1, p. 15-19, 1999.

DE GROOT, R. J.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; BROWN, C. S.; DROSTEN, C.; ENJUANES, L.; FOUCHIER, R. A. M.; GALIANO, M.; GORBALENYA, A. E.; MEMISH, Z. A.; PERLMAN, S.; POON, L. L. M.; SNIJDER, E. J.; STEPHENS, G. M.; WOO, P. C. Y.; ZAKI, A. M.; ZAMBON, M.; ZIEBUHR, J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of Virology**, v. 87, n. 14, p. 7790-7792, 2013.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; CIRONE, F.; D'ABRAMO, M.; LORUSSO, E.; GRECO, G.; MARI, V.; COLAIANNI, M. L.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 20, n. 1, p. 28-32, 2008a.

DECARO, N.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; MARI, V.; RADOGNA, A.; COLAIANNI, M. L.; CIRONE, F.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. **Journal of virological methods**, v. 151, n. 2, p. 167-171, 2008b.

DECARO, N.; MARI, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; GRECO, G.; CIRONE, F.; COLAIANNI, M. L.; CORDIOLI, P.; BUONAVOGLIA, C. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. **Veterinary microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 30-39, 2008c.

DENISON, M. R.; GRAHAM, R. L.; DONALDSON, E. F.; ECKERLE, L. D.; BARIC, R. S. Coronaviruses: an RNA proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. **RNA biology**, v. 8, n. 2, p. 270-279, 2011.

ENJUANES, L.; ZUÑIGA, S.; CASTAÑO-RODRIGUEZ, C.; GUTIERREZ-ALVAREZ, J.; CANTON, J.; SOLA, I. Chapter Eight - Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. In: J. Ziebuhr (Ed.). **Advances in virus research**. Academic Press, 2016. 245-286.

ERLES, K.; TOOMEY, C.; BROOKS, H. W.; BROWNLIE, J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. **Virology**, v. 310, n. 2, p. 216-223, 2003.

FISCHER, F.; PENG, D.; HINGLEY, S. T.; WEISS, S. R.; MASTERS, P. S. The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. **Journal of Virology**, v. 71, n. 2, p. 996-1003, 1997.

FU, K.; BARIC, R. S. Evidence for variable rates of recombination in the MHV genome. **Virology**, v. 189, n. 1, p. 88-102, 1992.

FULTON, R. W.; HERD, H. R.; SORENSEN, N. J.; CONFER, A. W.; RITCHEY, J. W.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J. Enteric disease in postweaned beef calves associated with Bovine coronavirus clade 2. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 27, n. 1, p. 97-101, 2015.

FULTON, R. W.; RIDPATH, J. F.; BURGE, L. J. Bovine coronaviruses from the respiratory tract: antigenic and genetic diversity. **Vaccine**, v. 31, n. 6, p. 886-892, 2013.

FULTON, R. W.; STEP, D. L.; WAHRMUND, J.; BURGE, L. J.; PAYTON, M. E.; COOK, B. J.; BURKEN, D.; RICHARDS, C. J.; CONFER, A. W. Bovine coronavirus (BCV) infections in transported commingled beef cattle and sole-source ranch calves. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, v. 75, n. 3, p. 191-199, 2011.

GALLAGHER, T. M.; PARKER, S. E.; BUCHMEIER, M. J. Neutralization-resistant variants of a neurotropic coronavirus are generated by deletions within the amino-terminal half of the spike glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 64, n. 2, p. 731-741, 1990.

GALLAGHER, T. M.; BUCHMEIER, M. J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. **Virology**, v. 279, n. 2, p. 371-374, 2001.

GELINAS, A. M.; BOUTIN, M.; SASSEVILLE, A. M.; DEA, S. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. **Virus research**, v. 76, n. 1, p. 43-57, 2001.

GORBALENYA, A. E.; ENJUANES, L.; ZIEBUHR, J.; SNIJDER, E. J. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. **Virus research**, v. 117, n. 1, p. 17-37, 2006.

GRAHAM, R. L.; BARIC, R. S. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. **Journal of Virology**, v. 84, n. 7, p. 3134-3146, 2010.

GUNN, L.; COLLINS, P. J.; O'CONNELL, M. J.; O'SHEA, H. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. **Irish veterinary journal**, v. 68, p. 31, 2015.

HAGGLUND, S.; SVENSSON, C.; EMANUELSON, U.; VALARCHER, J. F.; ALENIUS, S. Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 172, n. 2, p. 320-328, 2006.

HASCHEK, B.; KLEIN, D.; BENETKA, V.; HERRERA, C.; SOMMERFELD-STUR, I.; VILCEK, S.; MOESTL, K.; BAUMGARTNER, W. Detection of bovine torovirus in neonatal calf diarrhoea in Lower Austria and Styria (Austria). **Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health**, v. 53, n. 4, p. 160-165, 2006.

HASOKSUZ, M.; ALEKSEEV, K.; VLASOVA, A.; ZHANG, X.; SPIRO, D.; HALPIN, R.; WANG, S.; GHEDIN, E.; SAIF, L. J. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. **Journal of Virology**, v. 81, n. 10, p. 4981-4990, 2007.

HASOKSUZ, M.; HOET, A. E.; LOERCH, S. C.; WITTUM, T. E.; NIELSEN, P. R.; SAIF, L. J. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 14, n. 4, p. 308-313, 2002a.

HASOKSUZ, M.; LATHROP, S. L.; GADFIELD, K. L.; SAIF, L. J. Isolation of bovine respiratory coronaviruses from feedlot cattle and comparison of their biological and antigenic properties with bovine enteric coronaviruses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 10, p. 1227-1233, 1999b.

HASOKSUZ, M.; LATHROP, S.; AL-DUBAIB, M. A.; LEWIS, P.; SAIF, L. J. Antigenic variation among bovine enteric coronaviruses (BECV) and bovine respiratory coronaviruses (BRCV) detected using monoclonal antibodies. **Archives of Virology**, v. 144, n. 12, p. 2441-2447, 1999a.

HASOKSUZ, M.; SREEVATSAN, S.; CHO, K. O.; HOET, A. E.; SAIF, L. J. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. **Virus research**, v. 84, n. 1-2, p. 101-109, 2002b.

HECKERT, R. A.; SAIF, L. J.; HOBLET, K. H.; AGNES, A. G. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. **Veterinary microbiology**, v. 22, n. 2-3, p. 187-201, 1990.

HICK, P. M.; READ, A. J.; LUGTON, I.; BUSFIELD, F.; DAWOOD, K. E.; GABOR, L.; HORNITZKY, M.; KIRKLAND, P. D. Coronavirus infection in intensively managed cattle with respiratory disease. **Australian veterinary journal**, v. 90, n. 10, p. 381-386, 2012.

HISCOX, J. A.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Quantification of individual subgenomic mRNA species during replication of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. **Virus research**, v. 36, n. 2-3, p. 119-130, 1995.

HSIUNG, G. D. Diagnostic virology: from animals to automation. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 57, n. 5, p. 727-733, 1984.

HUSSAIN, K. A.; STORZ, J.; KOUSOULAS, K. G. Comparison of bovine coronavirus (BCV) antigens: monoclonal antibodies to the spike glycoprotein distinguish between vaccine and wild-type strains. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 442-445, 1991.

ICTV. 2017. International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus taxonomy: 2017 release. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: March, 20, 2018.

JARVIS, T. C.; KIRKEGAARD, K. The polymerase in its labyrinth: mechanisms and implications of RNA recombination. **Trends in genetics : TIG**, v. 7, n. 6, p. 186-191, 1991.

JEONG, J. H.; KIM, G. Y.; YOON, S. S.; PARK, S. J.; KIM, Y. J.; SUNG, C. M.; JANG, O. J.; SHIN, S. S.; KOH, H. B.; LEE, B. J.; LEE, C. Y.; KANG, M. I.; KIM, H. J.; PARK, N. Y.; CHO, K. O. Detection and isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. **The Journal of veterinary medical science**, v. 67, n. 2, p. 187-189, 2005.

JEREZ, J. A.; BRANDÃO, P. E.; BUZINARO, M. G.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 19-23, 2002.

KANNO, T.; HATAMA, S.; ISHIHARA, R.; UCHIDA, I. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. **The Journal of general virology**, v. 88, n. Pt 4, p. 1218-1224, 2007.

KANNO, T.; KAMIYOSHI, T.; ISHIHARA, R.; HATAMA, S.; UCHIDA, I. Phylogenetic studies of bovine coronaviruses isolated in Japan. **The Journal of veterinary medical science**, v. 71, n. 1, p. 83-86, 2009.

KAPIL, S.; TRENT, A. M.; GOYAL, S. M. Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. **Archives of virology**, v. 115, n. 1-2, p. 127-132, 1990.

KECK, J. G.; HOGUE, B. G.; BRIAN, D. A.; LAI, M. M. C. Temporal regulation of bovine coronavirus RNA synthesis. **Virus research**, v. 9, n. 4, p. 343-356, 1988.

KIN, N.; MISZCZAK, F.; DIANCOURT, L.; CARO, V.; MOUTOU, F.; VABRET, A.; AR GOUILH, M. Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 40, p. 186-191, 2016.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LAI, M. M.; ANDERSON, L. J.; PERLMAN, S. Coronaviridae. In: B. N. Fields; D. M. Knipe; P. M. Howley (Ed.). **Fields Virology**. 2007. 1305 - 1335.

LAI, M. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in virus research**, v. 48, p. 1-100, 1997.

LATHROP, S. L.; WITTUM, T. E.; LOERCH, S. C.; PERINO, L. J.; SAIF, L. J. Antibody titers against bovine coronavirus and shedding of the virus via the respiratory tract in feedlot cattle. **American journal of veterinary research**, v. 61, n. 9, p. 1057-1061, 2000.

LI, F. Evidence for a Common Evolutionary Origin of Coronavirus Spike Protein Receptor-Binding Subunits. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2856-2858, 2012.

LI, F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. **Antiviral research**, v. 100, n. 1, p. 246-254, 2013.

LI, F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. **Journal of Virology**, v. 89, n. 4, p. 1954-1964, 2015.

LI, W.; WONG, S. K.; LI, F.; KUHN, J. H.; HUANG, I. C.; CHOE, H.; FARZAN, M. Animal origins of the severe acute respiratory syndrome coronavirus: insight from ACE2-S-protein interactions. **Journal of Virology**, v. 80, n. 9, p. 4211-4219, 2006.

LIM, K. P.; LIU, D. X. The missing link in coronavirus assembly. Retention of the avian coronavirus infectious bronchitis virus envelope protein in the pre-Golgi compartments and physical interaction between the envelope and membrane proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 20, p. 17515-17523, 2001.

LIN, X. Q.; KL, O. E.; STORZ, J.; PURDY, C. W.; LOAN, R. W. Antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle during shipping fever pathogenesis. **Archives of virology**, v. 145, n. 11, p. 2335-2349, 2000.

LIN, X. Q.; O'REILLY, K. L.; STORZ, J. Antibody responses of cattle with respiratory coronavirus infections during pathogenesis of shipping fever pneumonia are lower with antigens of enteric strains than with those of a respiratory strain. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 1010-1013, 2002.

LIU, L.; HAGGLUND, S.; HAKHVERDYAN, M.; ALENIUS, S.; LARSEN, L. E.; BELAK, S. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 3, p. 957-960, 2006.

MALPICA, J. M.; FRAILE, A.; MORENO, I.; OBIES, C. I.; DRAKE, J. W.; GARCIA-ARENAL, F. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. **Genetics**, v. 162, n. 4, p. 1505-1511, 2002.

MARTÍNEZ, N.; BRANDÃO, P. E.; DE SOUZA, S. P.; BARRERA, M.; SANTANA, N.; DE ARCE, H. D.; PÉREZ, L. J. Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1870-1878, 2012.

MCBRIDE, R.; VAN ZYL, M.; FIELDING, B. C. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2991-3018, 2014.

MEBUS, C. A.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Pathology of neonatal calf diarrhea induced by a coronavirus-like agent. **Veterinary pathology**, v. 10, n. 1, p. 45-64, 1973.

MEITZLER, J. L.; HINDE, S.; BANFI, B.; NAUSEEF, W. M.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. R. Conserved cysteine residues provide a protein-protein interaction surface in dual oxidase (DUOX) proteins. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 10, p. 7147-7157, 2013.

MILLET, J. K.; WHITTAKER, G. R. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. **Virus research**, v. 202, p. 120-134, 2015.

MITRA, N.; CERNICCHIARO, N.; TORRES, S.; LI, F.; HAUSE, B. M. Metagenomic characterization of the virome associated with bovine respiratory disease in feedlot cattle identified novel viruses and suggests an etiologic role for influenza D virus. **Journal of General Virology**, v. 97, p. 1771–1784, 2016.

MORAND, S.; AGNANDJI, D.; NOEL-HUDSON, M. S.; NICOLAS, V.; BUISSON, S.; MACON-LEMAITRE, L.; GNIDEHOU, S.; KANIEWSKI, J.; OHAYON, R.; VIRION, A.; DUPUY, C. Targeting of the dual oxidase 2 N-terminal region to the plasma membrane. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 29, p. 30244-30251, 2004.

NARAYANAN, K.; MAEDA, A.; MAEDA, J.; MAKINO, S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 17, p. 8127-8134, 2000.

NEUMAN, B. W.; KISS, G.; KUNDING, A. H.; BHELLA, D.; BAKSH, M. F.; CONNELLY, S.; DROESE, B.; KLAUS, J. P.; MAKINO, S.; SAWICKI, S. G.; SIDDELL, S. G.; STAMOU, D. G.; WILSON, I. A.; KUHN, P.; BUCHMEIER, M. J. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **Journal of structural biology**, v. 174, n. 1, p. 11-22, 2011.

OHLSON, A.; HEUER, C.; LOCKHART, C.; TRAVEN, M.; EMANUELSON, U.; ALENIUS, S. Risk factors for seropositivity to bovine coronavirus and bovine respiratory syncytial virus in dairy herds. **The Veterinary record**, v. 167, n. 6, p. 201-206, 2010.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P. G.; PACHECO, M. D.; MASCARINI, L. M.; RIBEIRO, M. G.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; BARROS, B. J. P.; BORGES, A. S. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 419-424, 2007.

OMA, V. S.; TRAVEN, M.; ALENIUS, S.; MYRMEL, M.; STOKSTAD, M. Bovine coronavirus in naturally and experimentally exposed calves; viral shedding and the potential for transmission. **Virology journal**, v. 13, p. 100, 2016.

PARK, S. J.; JEONG, C.; YOON, S. S.; CHOY, H. E.; SAIF, L. J.; PARK, S. H.; KIM, Y. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; LEE, B. J.; CHO, H. S.; KIM, S. K.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3178-3188, 2006.

PARK, S. J.; KIM, G. Y.; CHOY, H. E.; HONG, Y. J.; SAIF, L. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; KIM, S. K.; SHIN, S. S.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. **Archives of virology**, v. 152, n. 10, p. 1885-1900, 2007.

PATON, D. J.; CHRISTIANSEN, K. H.; ALENIUS, S.; CRANWELL, M. P.; PRITCHARD, G. C.; DREW, T. W. Prevalence of antibodies to bovine virus diarrhoea virus and other viruses in bulk tank milk in England and Wales. **The Veterinary record**, v. 142, n. 15, p. 385-391, 1998.

RAAMSMAN, M. J.; LOCKER, J. K.; DE HOOGE, A.; DE VRIES, A. A.; GRIFFITHS, G.; VENNEMA, H.; ROTTIER, P. J. Characterization of the coronavirus mouse hepatitis virus strain A59 small membrane protein E. **Journal of Virology**, v. 74, n. 5, p. 2333-2342, 2000.

REKIK, M. R.; DEA, S. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. **Archives of virology**, v. 135, n. 3-4, p. 319-331, 1994.

REYNOLDS, D. J. Coronavirus replication in the intestinal and respiratory tracts during infection of calves. **Annales de recherches veterinaires. Annals of veterinary research**, v. 14, n. 4, p. 445-446, 1983.

REYNOLDS, D. J.; DEBNEY, T. G.; HALL, G. A.; THOMAS, L. H.; PARSONS, K. R. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. **Archives of virology**, v. 85, n. 1-2, p. 71-83, 1985.

ROCHA, C.; FORNELLS, L. A.; ROJAS, M.; LIBETAL, M.; MANCHEGO, A.; PEZO, D.; SANTOS, N. Molecular epidemiology of coronavirus in faeces of Brazilian calves and Peruvian camelid herds. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.12, p.037-042, 2018.

SAIF, L. J. ANIMAL CORONAVIRUSES: LESSONS FOR SARS. In: M. A. Knobler S, Lemon S, et al. (Ed.). **Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak: Workshop Summary**. Washington (DC): National Academies Press (US), 2004.

SAIF, L. J. Bovine respiratory coronavirus. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 26, n. 2, p. 349-364, 2010.

SAIF, L. J. Comparative Biology of Animal Coronaviruses: Lessons for SARS. In: M. Peiris; L. J. Anderson; A. D. Osterhaus; K. Stohr; K. y. Yuen (Ed.). **Severe Acute Respiratory Syndrome**. 2008.

SAIF, L. J.; HECKERT, R. A.; MILLER, K. L.; TAREK, M. M. Cell culture propagation of bovine coronavirus. **Journal of tissue culture methods**, v. 11, n. 3, p. 139-145, 1988.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In: M. A. Knobler S, Lemon S, et al. (Ed.). **The Cell: A Molecular Approach**. 1989.

SCHAEFER, C.; ROST, B. Predict impact of single amino acid change upon protein structure. **BMC genomics**, v. 13 Suppl 4, p. S4, 2012.

SCHOENTHALER, S. L.; KAPIL, S. Development and applications of a bovine coronavirus antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 6, n. 1, p. 130-132, 1999.

SENANAYAKE, S. D.; BRIAN, D. A. Bovine coronavirus I protein synthesis follows ribosomal scanning on the bicistronic N mRNA. **Virus research**, v. 48, n. 1, p. 101-105, 1997.

SINGASA, K.; SONGSERM, T.; LERTWATCHARASARAKUL, P.; ARUNVIPAS, P. Molecular and phylogenetic characterization of bovine coronavirus virus isolated from dairy cattle in Central Region, Thailand. v. 49, n. 7, p. 1523-1529, 2017.

SMITH, D. R.; TSUNEMITSU, H.; HECKERT, R. A.; SAIF, L. J. Evaluation of two antigen-capture ELISAs using polyclonal or monoclonal antibodies for the detection of bovine coronavirus. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 8, n. 1, p. 99-105, 1996.

SMITH, E. C.; SEXTON, N. R.; DENISON, M. R. Thinking Outside the Triangle: Replication Fidelity of the Largest RNA Viruses. **Annual review of virology**, v. 1, n. 1, p. 111-132, 2014.

SMITH, E. C.; DENISON, M. R. Coronaviruses as DNA wannabes: a new model for the regulation of RNA virus replication fidelity. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003760, 2013.

SOUZA, S. P. **Um estudo sobre a diversidade molecular dos genes S e HE de Coronavírus bovino (BCoV)**. 82 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

STIPP, D. T.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; TAKIUCHI, E.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. **Tropical animal health and production**, v. 41, n. 7, p. 1563-1567, 2009.

STORZ, J.; PURDY, C. W.; LIN, X.; BURRELL, M.; TRUAX, R. E.; BRIGGS, R. E.; FRANK, G. H.; LOAN, R. W. Isolation of respiratory bovine coronavirus, other cytocidal viruses, and Pasteurella spp from cattle involved in two natural outbreaks of shipping fever. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 10, p. 1599-1604, 2000.

STORZ, J.; ROTT, R.; KALUZA, G. Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. **Infect Immun**, v. 31, n. 3, p. 1214-1222, 1981.

STORZ, J.; ZHANG, X. M.; ROTT, R. Comparison of hemagglutinating, receptor-destroying, and acetylcholinesterase activities of avirulent and virulent bovine coronavirus strains. **Archives of Virology**, v. 125, n. 1, p. 193-204, 1992.

STOTT, E. J.; THOMAS, L. H.; BRIDGER, J. C.; JEBBETT, N. J. Replication of a bovine coronavirus in organ cultures of foetal trachea. **Veterinary Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 65-69, 1976.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Molecular analysis of the bovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 41, n. 4, p. 277-282, 2008.

TAKIUCHI, E.; BARREIROS, M. A. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Identification of a mutation in the spike protein cleavage site in Brazilian strains of wild-type bovine coronavirus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 699-703, 2007.

TAKIUCHI, E.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; FILIPPSEN, P.; ALFIERI, A. A. An outbreak of winter dysentery caused by bovine coronavirus in a high-production dairy cattle herd from a tropical country. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 57-61, 2009.

TAKIUCHI, E.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. **Journal of virological methods**, v. 131, n. 2, p. 148-154, 2006.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular biology and evolution**, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

THOMAS, C. J.; HOET, A. E.; SREEVATSAN, S.; WITTUM, T. E.; BRIGGS, R. E.; DUFF, G. C.; SAIF, L. J. Transmission of bovine coronavirus and serologic responses in feedlot calves under field conditions. **American journal of veterinary research**, v. 67, n. 8, p. 1412-1420, 2006.

THOMAS, L. H.; GOURLAY, R. N.; STOTT, E. J.; HOWARD, C. J.; BRIDGER, J. C. A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves. **Research in veterinary science**, v. 33, n. 2, p. 170-182, 1982.

TSUNEMITSU, H.; EL-KANAWATI, Z. R.; SMITH, D. R.; REED, H. H.; SAIF, L. J. Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 12, p. 3264-3269, 1995.

TSUNEMITSU, H.; SMITH, D. R.; SAIF, L. J. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. **Archives of virology**, v. 144, n. 1, p. 167-175, 1999.

TSUNEMITSU, H.; YONEMICHI, H.; HIRAI, T.; KUDO, T.; ONOE, S.; MORI, K.; SHIMIZU, M. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. **The Journal of veterinary medical science**, v. 53, n. 3, p. 433-437, 1991.

TSUNEMITSU, H.; SAIF, L. J. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. **Archives of virology**, v. 140, n. 7, p. 1303-1311, 1995.

UJIKE, M.; TAGUCHI, F. Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses*, v. 7, n. 4, p. 1700-1725, 2015.

UNDERDAHL, N. R.; MEBUS, C. A.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; MCGILL, L. D.; TWIEHAUS, M. J. Isolation of transmissible gastroenteritis virus from lungs of market-weight swine. **American journal of veterinary research**, v. 35, n. 9, p. 1209-1216, 1974.

VAUGHN, E. M.; HALBUR, P. G.; PAUL, P. S. Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 5, p. 3176-3184, 1995.

VIJGEN, L.; KEYAERTS, E.; MOES, E.; THOELLEN, I.; WOLLANTS, E.; LEMEY, P.; VANDAMME, A. M.; VAN RANST, M. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. **Journal of Virology**, v. 79, n. 3, p. 1595-1604, 2005.

VILCEK, S.; JACKOVA, A.; KOLESAROVA, M.; VLASAKOVA, M. Genetic variability of the S1 subunit of enteric and respiratory bovine coronavirus isolates. **Acta virologica**, v. 61, n. 2, p. 212-216, 2017.

VIPR. 2018. Virus Pathogen Database and Analysis Resource. Disponível em: <https://www.viprbrc.org/brc/vipr_allSpecies_search.spg?method=SubmitForm&decorator=corona>. Acesso em: March, 20, 2018.

WANG, F. I.; FLEMING, J. O.; LAI, M. M. Sequence analysis of the spike protein gene of murine coronavirus variants: study of genetic sites affecting neuropathogenicity. **Virology**, v. 186, n. 2, p. 742-749, 1992.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

WOO, P. C.; HUANG, Y.; LAU, S. K.; YUEN, K. Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1804-1820, 2010.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; LAM, C. S.; LAI, K. K.; HUANG, Y.; LEE, P.; LUK, G. S.; DYRTING, K. C.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. **Journal of Virology**, v. 83, n. 2, p. 908-917, 2009.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; YIP, C. C.; HUANG, Y.; TSOI, H. W.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Comparative analysis of 22 coronavirus HKU1 genomes reveals a novel genotype and evidence of natural recombination in coronavirus HKU1. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 7136-7145, 2006.

YOO, D.; PARKER, M. D.; SONG, J.; COV, G. J.; DEREGT, D.; BABIUK, L. A. Structural analysis of the conformational domains involved in neutralization of bovine coronavirus using deletion mutants of the spike glycoprotein S1 subunit expressed by recombinant baculoviruses. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 91-98, 1991.

YOO, D.; DEREGT, D. A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 2, p. 297-302, 2001.

ZHANG, X. M.; HERBST, W.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. **Journal of medical virology**, v. 44, n. 2, p. 152-161, 1994b.

ZHANG, X. M.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. **Virology**, v. 183, n. 1, p. 397-404, 1991.

ZHANG, X.; HASOKSUZ, M.; SPIRO, D.; HALPIN, R.; WANG, S.; VLASOVA, A.; JANIES, D.; JONES, L. R.; GHEDIN, E.; SAIF, L. J. Quasispecies of bovine enteric and respiratory coronaviruses based on complete genome sequences and genetic changes after tissue culture adaptation. **Virology**, v. 363, n. 1, p. 1-10, 2007.

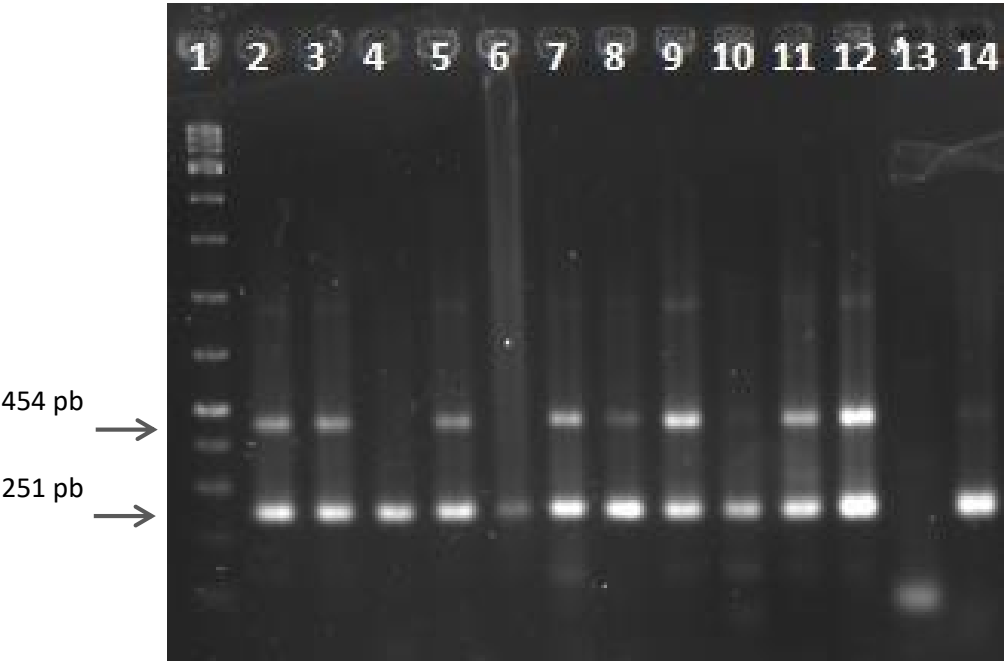
ZHANG, X.; HERBST, W.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Comparison of the S genes and the biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. **Archives of virology**, v. 134, n. 3-4, p. 421-426, 1994a.

ZHANG, Z.; ANDREWS, G. A.; CHARD-BERGSTROM, C.; MINOCHA, H. C.; KAPIL, S. Application of immunohistochemistry and in situ hybridization for detection of bovine coronavirus in paraffin-embedded, formalin-fixed intestines. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2964-2965, 1997.

ZIEBUHR, J. The coronavirus replicase. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 287, p. 57-94, 2005.

7 APÊNDICES

Apêndice A: Detecção do BCoV em secreções nasais por *Semi-nested* PCR. Setas indicam o tamanho molecular dos fragmentos na primeira etapa (454 bp) e segunda etapa (251 bp) de amplificação. Linha 1: Marcador de tamanho molecular 100 bp. Linhas 2 a 12: secreções nasais de bezerros da propriedade 1; Linha 13: controle negativo; Linha 14: Controle positivo (amostra *Kakegawa* BCoV).



Apêndice B: Matriz de identidade nucleotídica baseada em um fragmento parcial do gene S (1447 nt) da sequência de BCoV gerada neste estudo, frente as demais representativas disponíveis em bases públicas de dados.

[illegible]

Legenda:

BOV19-NS-UFPR/Brazil	KP284097.1/BCoV-WD-2003-WDBR-D-17/Brazil	KF169918.1/DEN-05-3/Denmark
HE616740.1/VB 24-11-CIEGO DE AVILA/Cuba	KP284096.1/BCoV-WD-2003-WDBR-9146/Brazil	DQ389656.1/KWD15/South Korea
EF424615.1/E-AH65/USA	DQ389657.1/KWD16/South Korea	M64668.1/BCV Norden-Vaccine/USA
KT318115.1/BCoV-FRA-EPI-Caen-2003-05/France	DQ389639.1/KCD8/South Korea	EU401989.1/BC94-Vaccine/South Korea
KT318111.1/BCoV-FRA-EPI-Caen-2005-01/France	DQ389635.1/KCD4/South Korea	AF220295.1/Quebec/Canada
KF169915.1/DEN-03-3/Denmark	DQ389634.1/KCD3/South Korea	DQ389659.1/KWD18/South Korea
EF424617.1/R-AH65/USA	KF272919.1/RVLC7/Ireland	DQ389636.1/KCD5/South Korea
DQ389641.1/KCD10/South Korea	DQ389653.1/KWD12/South Korea	AF058942.1/LY-138/USA
DQ389632.1/KCD1/South Korea	DQ389633.1/KCD2/South Korea	KF169926.1/SWE-C-07-2/Sweden
KF169921.1/SWE-N-05-2/Sweden	KF169927.1/SWE-I-07-3/Sweden	KF169940.1/SWE-P-10-4/Sweden
HE616739.1/VB 16-10-CIENFUEGOS/Cuba	KF169925.1/SWE-Z-07-1/Sweden	KF169939.1/SWE-Y-10-3/Sweden
HE616738.1/VB 7-09-MAYABEQUE/Cuba	DQ389654.1/KWD13/South Korea	KF169936.1/SWE-U-09-3/Sweden
DQ389660.1/KWD19/South Korea	AB354579.1/Kakegawa/Japan	KF169931.1/SWE-AC-08-1/Sweden
DQ389655.1/KWD14/South Korea	KF169923.1/SWE-M-06-3/Sweden	DQ479421.1/BR-UEL1/Brazil
DQ389652.1/KWD11/South Korea	KF169922.1/SWE-AC-06-1/Sweden	D00731.1/F15/France
DQ389637.1/KCD6/South Korea	KF169916.1/DEN-05-1/Denmark	U00735.2/Mebus/USA
AY935643.1/KWD7/South Korea	KT318112.1/BCoV-FRA-EPI-Caen-2005-02/France	EU814648.1/438-06-TN-50/Italy
KF169930.1/SWE-C-07-6/Sweden	KF169913.1/DEN-03-1/Denmark	DQ479422.1/BR-UEL2/Brazil
KF169920.1/SWE-N-05-1/Sweden	KF169917.1/DEN-05-2/Denmark	DQ479423.1/BR-UEL3/Brazil

Apêndice C: Matriz de identidade nucleotídica baseada na região HVR do gene S (438 nt) da sequência de BCoV gerada neste estudo, frente as demais representativas disponíveis em bases públicas de dados

Cód. Acesso	U00735.2 BOV19-NS-UFPB Brasil	AY935638.1 AY935642.1	HE61740.1	DQ811784.2	AY935637.1	KT318115.1	KT318111.1	MF695631.1	KF189915.1	AY935629.1	KF189921.1	HE61679.1	HE61678.1	DQ389637.1	KF189920.1	KF204951.1	DQ389631.1	DQ389635.1	KF189925.1	AB55479.1	KF189918.1	M64668.1	AF220265.1	AF058942.1	AY960192.1	AY960191.1	AY960190.1	JF45150.1	JQ318864.1	JF795397.1	DQ479421.1	DQ479422.1	DQ479423.1	KP208779.1	DQ320763.1	DQ419461.1	D00731.1	DQ320764.1	KY612617.1	KY612618.1	KY612619.1	KY612620.1	KY612621.1	KT314681.1	KT381469.1	KT381470.1	KT381471.1							
U00735.2	ID	0,954	0,968	0,968	0,961	0,97	0,968	0,958	0,958	0,972	0,961	0,97	0,961	0,961	0,961	0,958	0,958	0,961	0,963	0,961	0,99	0,947	0,99	0,99	0,974	0,933	0,949	0,947	0,961	0,958	0,958	0,963	0,963	0,956	0,965	0,986	0,984	0,974	0,958	0,952	0,958	0,956	0,961	0,965	0,956	0,952								
BOV19-NS-UFPB Brasil	0,954 ID		0,972	0,972	0,974	0,961	0,972	0,968	0,97	0,968	0,97	0,97	0,972	0,97	0,97	0,963	0,97	0,979	0,963	0,968	0,965	0,958	0,956	0,958	0,958	0,965	0,962	0,917	0,915	0,979	0,981	0,981	0,984	0,984	0,984	0,981	0,997	0,977	0,974	0,979	0,977	0,97	0,977	0,974	0,974	0,979	0,97	0,974						
AY935638.1	0,968	0,972 ID		1	0,988	0,979	1	0,977	0,974	0,995	0,979	0,997	0,977	0,984	0,984	0,986	0,979	0,984	0,986	0,99	0,984	0,977	0,965	0,977	0,972	0,979	0,917	0,933	0,931	0,984	0,981	0,981	0,984	0,984	0,984	0,981	0,997	0,977	0,974	0,979	0,977	0,97	0,977	0,974	0,974	0,979	0,97	0,974						
AY935642.1	0,968	0,972	1 ID		0,988	0,979	1	0,977	0,974	0,995	0,979	0,997	0,977	0,984	0,984	0,986	0,979	0,984	0,986	0,99	0,984	0,977	0,965	0,977	0,972	0,979	0,917	0,933	0,931	0,984	0,981	0,981	0,984	0,984	0,984	0,981	0,997	0,977	0,974	0,979	0,977	0,97	0,977	0,974	0,974	0,979	0,97	0,974						
HE61740.1	0,961	0,974	0,988	0,988 ID		0,972	0,988	0,974	0,972	0,984	0,977	0,986	0,974	0,995	0,995	0,974	0,977	0,981	0,974	0,979	0,972	0,97	0,963	0,97	0,965	0,972	0,911	0,927	0,924	0,981	0,979	0,979	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981				
DQ811784.2	0,97	0,961	0,979	0,979	0,972 ID		0,979	0,97	0,968	0,979	0,972	0,981	0,968	0,968	0,965	0,97	0,972	0,965	0,97	0,972	0,979	0,958	0,974	0,972	0,92	0,936	0,933	0,972	0,97	0,97	0,974	0,974	0,974	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968	0,968					
AY935637.1	0,968	0,972	1	1	0,988	0,979 ID		0,977	0,974	0,995	0,979	0,997	0,977	0,984	0,984	0,986	0,979	0,984	0,986	0,99	0,984	0,977	0,965	0,977	0,972	0,979	0,917	0,933	0,931	0,984	0,981	0,981	0,984	0,984	0,984	0,981	0,997	0,977	0,974	0,979	0,977	0,97	0,977	0,974	0,974	0,979	0,97	0,974						
KT318115.1	0,958	0,968	0,977	0,977	0,974	0,97	0,977 ID		0,993	0,972	0,997	0,974	0,988	0,97	0,97	0,963	0,99	0,979	0,963	0,968	0,988	0,968	0,968	0,984	0,968	0,963	0,977	0,908	0,924	0,922	0,974	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977				
KT318111.1	0,956	0,97	0,974	0,974	0,972	0,968	0,974	0,993 ID		0,97	0,995	0,972	0,986	0,968	0,968	0,961	0,988	0,977	0,961	0,965	0,986	0,965	0,981	0,965	0,961	0,974	0,906	0,922	0,92	0,972	0,979	0,979	0,974	0,974	0,974	0,968	0,977	0,965	0,963	0,963	0,979	0,986	0,979	0,986	0,963	0,968	0,958	0,972						
KM958531.1	0,972	0,968	0,995	0,995	0,984	0,979	0,995	0,972	0,97 ID		0,974	0,997	0,972	0,979	0,979	0,981	0,974	0,979	0,981	0,986	0,979	0,981	0,961	0,974	0,979	0,981	0,986	0,979	0,981	0,961	0,981	0,977	0,974	0,922	0,938	0,936	0,979	0,977	0,977	0,979	0,979	0,977	0,993	0,981	0,974	0,979	0,972	0,965	0,972	0,97	0,97	0,974	0,965	0,97
KF189915.1	0,961	0,97	0,979	0,979	0,977	0,972	0,979	0,997	0,995	0,974 ID		0,977	0,99	0,972	0,972	0,965	0,993	0,981	0,965	0,97	0,99	0,97	0,986	0,97	0,965	0,979	0,911	0,927	0,924	0,977	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979		
AY935635.1	0,97	0,97	0,997	0,997	0,986	0,981	0,997	0,974	0,972	0,997	0,977 ID		0,974	0,981	0,981	0,984	0,977	0,981	0,984	0,988	0,981	0,979	0,963	0,979	0,963	0,984	0,988	0,981	0,979	0,963	0,979	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	
KF189921.1	0,961	0,972	0,977	0,977	0,974	0,968	0,977	0,988	0,986	0,972	0,99	0,974 ID		0,97	0,97	0,963	0,997	0,979	0,963	0,968	0,99	0,965	0,977	0,965	0,965	0,974	0,966	0,922	0,92	0,974	0,977	0,977	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979	0,979
HE61739.1	0,961	0,97	0,984	0,984	0,995	0,968	0,984	0,97	0,968	0,979	0,972	0,981	0,97 ID		1	0,974	0,972	0,977	0,974	0,979	0,968	0,97	0,958	0,97	0,965	0,968	0,911	0,927	0,924	0,977	0,974	0,974	0,974	0,974	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	
HE61737.1	0,961	0,97	0,984	0,984	0,995	0,968	0,984	0,97	0,968	0,979	0,972	0,981	0,97	1 ID		0,974	0,972	0,977	0,974	0,979	0,968	0,97	0,958	0,97	0,965	0,968	0,911	0,927	0,924	0,977	0,974	0,974	0,974	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977	0,977
DQ389637.1	0,958	0,963	0,986	0,986	0,974	0,965	0,986	0,963	0,961	0,981	0,965	0,984	0,963	0,974	0,974 ID		0,965	0,97	0,995	0,995	0,97	0,968	0,952	0,968	0,963	0,965	0,988	0,924	0,922	0,97	0,968	0,968	0,97	0,97	0,97	0,968	0,984	0,968	0,965	0,967	0,963	0,956	0,963	0,956	0,963	0,961	0,961	0,965	0,956	0,965	0,965	0,965		
KF189920.1	0,958	0,97	0,979	0,979	0,977	0,97	0,979	0,99	0,988	0,974	0,993	0,977	0,997	0,972	0,972	0,965 ID		0,981	0,965	0,97	0,993	0,968	0,979	0,968	0,963	0,977	0,988	0,924	0,922	0,977	0,979	0,979	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981
KP204951.1	0,961	0,979	0,984	0,984	0,981	0,972	0,984	0,979	0,977	0,979	0,981	0,981	0,979	0,977	0,977	0,97	0,981 ID			0,97	0,974	0,977	0,97	0,968	0,97	0,965	0,977	0,911	0,927	0,924	0,986	0,988	0,988	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986	0,986
DQ389639.1	0,963	0,963	0,986	0,986	0,974	0,965	0,986	0,963	0,961	0,981	0,965	0,984	0,963	0,974	0,974	0,995	0,965	0,97 ID			0,995	0,97	0,968	0,952	0,968	0,963	0,97	0,911	0,927	0,924	0,97	0,968	0,968	0,97	0,97	0,97	0,968	0,984	0,968	0,97	0,974	0,963	0,956	0,963	0,961	0,965	0,965	0,965	0,965	0,965	0,965	0,965	0,965	
DQ389635.1	0,963	0,968	0,99	0,99	0,979	0,97	0,99	0,968	0,965	0,986	0,97	0,988	0,968	0,979	0,979	0,995	0,97	0,974	0,995 ID			0,974	0,972	0,956	0,972	0,968	0,97	0,913	0,929	0,927	0,974	0,972	0,972	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974
KF189925.1	0,961	0,965	0,984	0,984	0,972	0,972	0,984	0,988	0,966	0,979	0,99	0,981	0,99	0,968	0,968	0,97	0,993	0,977	0,97	0,974 ID			0,97	0,977	0,97	0,965	0,979	0,911	0,927	0,924	0,972	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974	0,974
AB55479.1	0,99	0,958	0,977	0,977	0,97	0,979	0,984	0,968	0,965	0,981	0,97	0,979	0,965	0,97	0,97	0,968	0,968	0,97	0,968	0,972	0,97 ID			0,956	1	0,995	0,979	0,94	0,956	0,954	0,97	0,968	0,968	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972	0,972
KF189918.1	0,947	0,956	0,965	0,965	0,963	0,958	0,965	0,984	0,981	0,961	0,986	0,963	0,977	0,958	0,958	0,952	0,979																																					

Legenda:

U00735.2: Mebus/USA	KF169920.1: SWE-N-05-1/Sweden	DQ479421.1: BR-UEL1/Brazil
BOV19-NS-UFPR/Brazil	KP284096.1: WDBR-9146/Brazil	DQ479422.1: BR-UEL2/Brazil
AY935638.1: KWD2/South Korea	DQ389639.1: KCD8/South Korea	DQ479423.1: BR-UEL3/Brazil
AY935642.1: KWD6/South Korea	DQ389635.1: KCD4/South Korea	KP208779.1: BR-UEL11/Brazil
HE616740.1: VB 24-11-CIEGO DE AVILA/Cuba	KF169925.1: SWE-Z-07-1/Sweden	DQ320763.1: 232NS/USA
DQ811784.2: DB2/USA	AB354579.1: Kakegawa/Japan	JQ741969.1: Nebraska (NVSL)/USA
AY935637.1: KWD1/South Korea	KF169918.1: DEN-05-3/Denmark	D00731.1: F15/France
KT318115.1: BCoV-FRA-EPI-Caen-2003-05/France	M64668.1: BCV Norden-Vaccine/USA	DQ320764.1: 182NS/USA
KT318111.1: BCoV-FRA-EPI-Caen-2005-01/France	AF220295.1: Quebec/Canada	KY612617.1: AT13/Austria
KM985631.1: HLJ-14/China	AF058942.1: LY-138/USA	KY612618.1: AT15/Austria
KF169915.1: DEN-03-3/Denmark	AY606192.1: USP-02/Brazil	KY612619.1: SK21735/Slovakia
AY935639.1: KWD3/South Korea	AY606193.1: USP-03/Brazil	KY612620.1: SKcrevo/Slovakia
KF169921.1: SWE-N-05-2/Sweden	AY606194.1: USP-04/Brazil	KT381468.1: PA11/Brazil
HE616739.1: VB 16-10-CIENFUEGOS-2010/Cuba	JF345150.1: WDBR-B6/Brazil	KT381469.1: PB2/Brazil
HE616738.1: VB 7-09-MAYABEQUE-2009/Cuba	JQ918864.1: WDBR-R-58/Brazil	KT381470.1: PB9/Brazil
DQ389637.1: KCD6/South Korea	JF795397.1: WDBR-E-715/Brazil	KT381471.1: PD1/Brazil